

ENCYCLOPÉDIE PÉRIODIQUE DES SCIENCES MÉDICO-BILOGIQUES

Section : MICROBIOLOGIE ET APPLICATIONS A LA BIOLOGIE

ANNALES DE L'INSTITUT PASTEUR

FONDÉES SOUS LE PATRONAGE DE L. PASTEUR

PAR E. DUCLAUX

ET CONTINUÉES PAR

E. ROUX (1904)

A. CALMETTE (1922)

COMITÉ DE DIRECTION

Gab. BERTRAND, L. MARTIN, G. RAMON,
J. TREFOUËL,

assistés des Professeurs et Chefs de service de l'Institut Pasteur,

Secrétaire général : A. BOQUET.



PARIS

MASSON ET C^{ie}, ÉDITEURS

LIBRAIRES DE L'ACADÉMIE DE MÉDECINE

120, Boulevard Saint Germain (6^e)

SOMMAIRE DES N^{os} 5-6

	Pages.
Influence exercée sur la tuberculose du cobaye par le BCG administré par scarifications cutanées, par L. NÈGRE et J. BRETEY.	161
Les agressines bactériennes et leur action favorisante spécifique sur l'infection, par A. BORVIN et A. DELAUNAY.	163
Le potentiel d'oxydo-réduction au cours de la régénération des milieux employés pour la culture des anaérobies, par MARCEL RAYNAUD et MAX VISCONTINI.	172
Affinités des protéides pour le cuivre, par MACHEBOEUF et M. VISCONTINI.	188
Recherches sur les nucléoprotéides des micro-organismes. — II. Sur la nature des protéides phosphorés des levures, par RENÉ SARCIRON.	201
Un nouveau réactif biologique de l'acide <i>p</i> -aminobenzoïque, le Trypanosomide <i>Strigomonas oncopelti</i> , par MARGUERITE et ANDRÉ LWOFF.	206
Action sur l'organisme de la <i>p</i> -aminophénylsulfamino-2-pyrimidine et de la méthylidiazine, par RENÉ MARTIN, BERNARD SUREAU et YVONNE JOYEUX.	210
Association des microbiologistes de langue française (sommaire page 4 de la couverture).	217

Œuvres de Pasteur réunies par PASTEUR VALLERY-RADOT, tome VII « Mélanges scientifiques et littéraires. Index analytique de l'œuvre de Pasteur ». Un vol. gr. in-8° de 666 pages. Masson et C^{ie}, édit., Paris, 1939 : 200 fr. (5 dollars 25).

Albert Calmette. Sa vie. Son œuvre scientifique, par P. NOËL BERNARD et LÉOPOLD NÈGRE. Préface de Pasteur Vallery-Radot. Avant-propos de A. Yersin. Un vol. de 274 pages. Masson et C^{ie}, édit., Paris, 1939 : 50 fr. (1 dollar 15).

J. BORDET. — Traité de l'immunité dans les maladies infectieuses. Deuxième édit. Un volume de 880 pages. Masson et C^{ie}, édit., Paris, 1939 : 175 fr. (3 dollars 90).

ANDRÉ-R. PRÉVOT. — Manuel de classification et de détermination des bactéries anaérobies. Un volume in-8° de 228 pages (Monographie de l'Institut Pasteur). Masson et C^{ie}, édit., Paris, 1940 : 50 fr. (1 dollar 15).

MARGUERITE LWOFF. — Recherches sur le pouvoir de synthèse des flagellés trypanosomides. Un vol. de 244 pages (Monographie de l'Institut Pasteur). Masson et C^{ie}, édit., Paris, 1941 : 50 fr. (1 dollar 15).

L. NÈGRE et J. BRETEY. — Vaccination par le B. C. G. par scarifications cutanées. Préface du professeur A. Marfan. Un vol. de 104 pages avec 48 fig. (Collection Médecine et Chirurgie : Recherches et applications). Masson et C^{ie}, édit., Paris, 1942 : 25 fr.

L. JUST TIN-BESANÇON et A. LWOFF. — Vitamine antipellagreuse et avitaminoses nicotiniques. Un vol. de 288 pages. Masson et C^{ie}, édit., Paris, 1942 : 90 fr.

MADELEINE MOREL. — L'acide nicotinique facteur de croissance pour « *Proteus vulgaris* » (Monographie de l'Institut Pasteur). Masson et C^{ie} édit., Paris, 1943 : 65 fr.

ANDRÉ LWOFF, chef de Service à l'Institut Pasteur. — L'évolution physiologique. Etude des pertes de fonctions chez les Micro-organismes. Hermann et C^{ie}, édit., Paris, 1944 : 215 fr.

N. B. — Le paiement est accepté en toutes monnaies étrangères au cours du dollar au moment du règlement.

PRIX DE L'ABONNEMENT POUR 1945

France et Colonies françaises : 240 fr.; Étranger : 340 fr..

Changement d'adresse : 5 fr.

Secrétariat, 25, rue du Dr Roux, Paris (XV^e).

Cette Revue constitue une des sections de
L'ENCYCLOPÉDIE PÉRIODIQUE DES SCIENCES MÉDICO-BIOLOGIQUES

Prix d'abonnement à l'ensemble des 26 Sections

France et Colonies : 4.150 Fr.

Etranger : Tarif I, 6.000 Fr.; Tarif II, 6.140 Fr.

ANNALES DE L'INSTITUT PASTEUR

INFLUENCE EXERCÉE SUR LA TUBERCULOSE DU COBAYE PAR LE BCG ADMINISTRÉ PAR SCARIFICATIONS CUTANÉES

par L. NÈGRE et J. BRETEY.

Depuis que le BCG est utilisé dans la vaccination contre la tuberculose des enfants nouveau-nés et des sujets anergiques de tous âges, de nombreux auteurs ont essayé de se rendre compte s'il a une action curative sur cette maladie. Ils ont injecté dans ce but à plusieurs reprises de faibles doses de ce germe sous la peau ou dans le derme de sujets atteints de diverses formes de tuberculose. A part les incidents locaux (formation de nodules et d'abcès) que ces injections peuvent provoquer, il ne semble pas qu'elles aient entraîné, à quelques exceptions près, des réactions focales ou générales préjudiciables, mais elles n'ont pas retardé l'évolution des lésions.

Pas plus que ces essais cliniques, l'expérimentation sur les animaux n'a permis de mettre en évidence une action favorable exercée par les injections répétées de BCG sur le processus tuberculeux. D'après L. Nègre et J. Valtis ainsi que d'après I. Balteanu, A. Toma et Ana Garaguli, l'ingestion répétée de bacilles BCG par des cobayes venant d'être infectés avec un bacille tuberculeux virulent n'exerce aucune influence sur la marche de leur infection.

Des cobayes tuberculeux, traités par J. Lévitane, D. Lokhoff et V. Krosmodemianski, au moyen d'injections sous-cutanées, répétées tous les quatorze jours, de 1/500 à 3/500 de milligramme

de BCG, ont présenté les mêmes lésions que les cobayes témoins non traités. Cependant leur survie aurait été plus longue et le processus tuberculeux aurait eu une tendance à prendre un caractère fibreux.

Pour I. Balanescu, T. Veber et I. Gaspar, le traitement du cobaye par des injections sous-cutanées de doses de BCG comprises entre 0,001 mg. et 0,1 mg., faites tous les jours à partir de la date d'infection par un bacille tuberculeux virulent, reste sans action. A la dose de 0,1 mg., le BCG, administré de la même façon, a une influence aggravante. Par contre, aux doses de 0,1 mg. et de 1 mg., ce bacille, injecté tous les dix jours sous la peau, a paru avoir une légère action retardante sur le processus tuberculeux du cobaye.

A. Radossavliévitch et ses collaborateurs ont constaté que, chez des cobayes infectés par la voie sous-cutanée ou intrapéritonéale avec 0,001 mg. de bacilles tuberculeux virulents, des injections sous la peau de 2 à 4 millions de bacilles BCG effectuées les premier, cinquième, vingt-huitième et soixante-dix-septième jours après la date d'inoculation, n'ont pas modifié l'évolution de la tuberculose.

Les nouveaux progrès effectués, depuis quelques années, dans la technique de la vaccination nous ont incités à reprendre ces recherches au point de vue expérimental. Les travaux de S. R. Rosenthal sur la vaccination par piqûres et les nôtres sur la prémunition par scarifications ont prouvé qu'en introduisant le BCG par la voie cutanée chez le cobaye, on obtient une allergie et une résistance antituberculeuse qui ont le triple avantage d'apparaître précocement, d'atteindre une grande intensité et de durer longtemps (au moins trois ans). L'étude histologique, faite par J. Bretey de la peau du cobaye scarifié avec le BCG, lui a montré l'existence d'un petit nodule cutané évoluant en six à huit semaines et formé de cellules épithélioïdes et de cellules géantes avec de nombreux bacilles qui se multiplient activement jusque vers le vingtième jour après la vaccination et disparaissent vers le quarantième jour. La dispersion des bacilles-vaccins est difficile à mettre en évidence. Aussi ne peut-on s'empêcher de penser que l'établissement de cette lésion cutanée locale joue un rôle important dans l'apparition de l'allergie et de l'immunité.

En clinique humaine, Marfan a mis en évidence la protection exercée vis-à-vis d'une tuberculose pulmonaire par les écouvelles guéries de l'enfance et par les lésions lupiques, et certains cliniciens ont constaté l'influence favorable, sur l'évolution d'une tuberculose pulmonaire grave, d'une lésion cutanée apparaissant au cours de celle-ci. Aussi H. Kutschera-Aichbergen préconise une méthode de traitement de la tuberculose chronique des poumons et du larynx par des scarifications de la peau imprégnées de

bacilles tuberculeux virulents et vivants, qu'il répète chaque mois. Cet auteur emploie soit les bacilles tuberculeux isolés du malade qu'il veut traiter, soit des bacilles d'une souche très virulente. Pour Kutschera-Aichbergen, cette méthode de traitement ne réussit que lorsqu'on se sert de bacilles tuberculeux d'une très grande virulence. Cependant, E. Coulaud et M^{lle} G. Lécuyer ont signalé qu'ils obtiennent dans certains cas de bons résultats en suivant la même technique, mais en utilisant des bacilles tuberculeux morts.

Nous avons donc été amenés à rechercher si des scarifications cutanées avec le BCG, répétées à des intervalles plus ou moins rapprochés et avec des suspensions de ce germe à différentes concentrations, réussiraient mieux que les injections sous-cutanées du même bacille à modifier l'évolution de la tuberculose du cobaye. Celle-ci évolue avec une telle rapidité qu'on dispose de très peu de temps pour que le traitement employé puisse agir. Aussi avons-nous traité par des scarifications cutanées avec le BCG non seulement des cobayes qu'on venait de tuberculiser, mais aussi d'autres cobayes qui ont été préalablement vaccinés par la même méthode ou par voie sous-cutanée avant d'être infectés avec un bacille tuberculeux virulent. Au moment où ces cobayes ont été sacrifiés, leurs lésions ont été comparées avec celles des cobayes vaccinés non traités.

I. — COBAYES INFECTÉS PAR UN BACILLE TUBERCULEUX VIRULENT ET TRAITÉS AVEC DU BCG ADMINISTRÉ PAR DES SCARIFICATIONS CUTANÉES.

EXPÉRIENCE 1. — Le 29 janvier 1940, douze cobayes sont infectés en pratiquant 6 scarifications de 1 cm. sur la face interne de la cuisse gauche dans 1 goutte de la suspension en eau physiologique de la souche de bacilles tuberculeux humains 239, contenant 0,001 mg. de germes par centimètre cube.

Huit d'entre eux subissent à partir du 31 janvier, deux fois par semaine, 6 scarifications de 1 cm. de longueur dans 1 goutte d'une suspension de BCG contenant 100 mg. de germes par centimètre cube pendant le premier mois et 200 mg. pendant le second mois. Quatre cobayes sont conservés comme témoins. Ils sont tous sacrifiés le 12 mars.

Chez les traités comme chez les témoins, les ganglions sous-lombaires atteignent un volume variant entre celui d'un pois et celui d'une noisette. Chez les cobayes traités, deux cobayes n'ont pas de lésions de la rate, quatre ont de 1 à 6 tubercules et deux de nombreux tubercules sur cet organe. Aucun d'eux ne présente de lésions sur le foie et les poumons. Chez les témoins, le premier cobaye n'a aucune lésion de la rate, le second aucun tubercule sur cet organe, mais quelques tubercules sur les poumons, le troisième a 6 petits tubercules sur la rate, et le quatrième de nombreux tubercules sur cet organe et quelques lésions sur le foie et les poumons.

Les cobayes traités ont donc présenté à peu près les mêmes lésions ganglionnaires et spléniques que les cobayes témoins, mais il semble que chez les traités, il y a eu, par rapport aux témoins, un léger retard dans la généralisation des lésions au foie et aux poumons.

EXPÉRIENCE 2. — Le 3 février 1943, dix-neuf cobayes sont infectés par inoculation sous la peau de 1/5.000 de milligramme de la souche Hum. 239. Douze d'entre eux reçoivent les premier, quinzième et trentième jours après leur infection, 6 scarifications cutanées de 1 cm. de longueur dans I goutte de la suspension de BCG contenant 20 mg. de ces germes par centimètre cube. Ils sont sacrifiés ainsi que les témoins le 12 mars 1943.

Chez les cobayes traités et les cobayes témoins, les ganglions sous-lombaires varient, comme volume, entre ceux d'un pois et d'un haricot. Dans le lot des traités, quatre cobayes n'ont que quelques rares tubercules sur cet organe, tous les autres présentent de très nombreux tubercules spléniques avec, dans la plupart des cas, un certain nombre de tubercules sur le foie et les poumons. Chez les cobayes témoins, deux n'ont que quelques tubercules sur la rate, les autres présentent de très nombreuses lésions sur cet organe avec des tubercules plus ou moins nombreux sur le foie et les poumons.

Aucune différence n'a donc été constatée entre les lésions des cobayes traités et celles des cobayes témoins.

EXPÉRIENCE 3. — Douze cobayes sont infectés, le 20 mai 1943, par inoculation sous la peau de 1/2.000 de milligramme de la souche de bacilles tuberculeux humains 432.

Sept d'entre eux reçoivent, deux jours après, en quatre points différents, nuque, flancs et dos, 4 scarifications cutanées de 1 cm. de longueur dans I goutte de la suspension de BCG contenant 200 mg. de germes par centimètre cube. Cinq cobayes sont conservés comme témoins.

Ils sont tous sacrifiés le 19 juillet suivant. Les cobayes traités et les cobayes témoins ont les mêmes lésions : ganglions sous-lombaires dont les dimensions varient entre celles d'un pois et d'un haricot, assez nombreux tubercules sur la rate, absence de lésions sur le foie, quelques tubercules sur les poumons chez deux cobayes dans chaque lot.

Malgré le traitement qu'ils ont subi par des scarifications multiples, les cobayes traités ont donc présenté les mêmes lésions que les cobayes témoins.

II. — COBAYES VACCINÉS PAR LE BCG, INFECTÉS PAR UN BACILLE TUBERCULEUX VIRULENT ET TRAITÉS PAR LE BCG ADMINISTRÉ PAR SCARIFICATIONS CUTANÉES.

EXPÉRIENCE 4. — Douze cobayes sont vaccinés le 15 juin 1942 par 6 scarifications cutanées de 1 cm. de longueur dans I goutte de la suspension de BCG contenant 5 mg. par centimètre cube.

Le 10 juillet suivant, ils sont infectés par inoculation sous-cutanée

de 1/5.000 de milligramme de la souche de bacilles tuberculeux humains 239. Sept d'entre eux reçoivent les 12 juillet, 21 août, 6 septembre et 3 octobre, 6 scarifications cutanées de 1 cm. de longueur dans 1 goutte de la suspension de BCG contenant 20 mg. de ces germes par centimètre cube.

Cinq cobayes sont conservés comme témoins. Ils sont tous sacrifiés le 13 novembre 1942. Il n'y a pas de différence entre les lésions des cobayes traités et celles des cobayes témoins. Dans les deux groupes, les ganglions sous-lombaires varient, comme volume, entre ceux d'un pois et d'un haricot.

Chez les traités, trois cobayes n'ont aucune lésion sur la rate, les autres présentent quelques rares tubercules sur cet organe. Quatre cobayes n'ont aucune lésion sur le foie et les poumons, les trois autres n'ont que quelques rares tubercules sur l'un ou l'autre de ces organes.

Chez les témoins, tous les cobayes ont des lésions de la rate, rares chez quatre d'entre eux, nombreuses chez le cinquième ; tous ont également d'assez nombreux tubercules sur le foie et les poumons.

Si les cobayes traités et les cobayes témoins ont présenté à peu près les mêmes lésions des ganglions et de la rate, il semble que chez les premiers, il y a eu un peu moins de tubercules sur le foie et sur les poumons que chez les seconds.

EXPÉRIENCE 5. — Vingt cobayes sont vaccinés le 10 septembre 1942 par 6 scarifications cutanées à la nuque dans 3 gouttes de la suspension de BCG contenant 20 mg. de germes par centimètre cube. Le 25 novembre suivant ils sont infectés par inoculation sous-cutanée de 1/5.000 de milligramme de la souche de bacilles tuberculeux humains 239. Ces cobayes sont séparés en quatre lots. Ceux du premier lot sont traités par 6 scarifications cutanées dans III gouttes de la suspension de BCG contenant 20 mg. de ces germes par centimètre cube aux dates suivantes : 26 novembre 1942, 6 décembre 1942, 8 janvier 1943, 29 janvier 1943, 11 mars 1943, 1^{er} avril 1944 ; ceux du deuxième lot reçoivent aux mêmes dates le même nombre de scarifications dans III gouttes d'une suspension de bacilles tuberculeux humains tués par la chaleur, contenant 20 mg. de germes par centimètre cube, afin de comparer l'action de ces derniers avec celle de bacilles vivants avirulents ; ceux du troisième lot ont été traités aux mêmes dates par injection sous-cutanée de 2 mg. de BCG. Les cobayes du quatrième lot ont été conservés comme témoins. Tous ces animaux sont sacrifiés le 30 avril 1943. Aucune différence n'a été constatée entre les lésions des cobayes de ces différents lots. Leurs rates avaient en moyenne 10 à 15 tubercules. Dans chaque lot, quelques-uns d'entre eux, à peu près dans la même proportion, présentaient quelques tubercules sur le foie et les poumons.

EXPÉRIENCE 6. — La même expérience est faite sur quarante cobayes divisés en quatre lots, mais vaccinés non par la voie cutanée, mais par injection sous-cutanée de 2 mg. de BCG. Un groupe de cobayes est conservé comme témoin. Les trois autres groupes sont traités de la même façon que dans l'expérience précédente et aux mêmes dates. Ils sont également sacrifiés le 30 avril 1943.

Les résultats ont été les mêmes que dans l'expérience précédente.

Dans l'une et l'autre de ces expériences, il n'y a pas eu de différences appréciables entre les lésions des cobayes témoins et celles des cobayes traités.

CONCLUSIONS

Chez les cobayes qui viennent d'être infectés par inoculation d'un bacille tuberculeux virulent, le traitement par le BCG administré par des scarifications cutanées tous les quinze jours ou tous les mois ne paraît pas modifier l'évolution des lésions. S'il n'exerce pas une action retardante sur ces dernières, il n'a pas non plus d'influence aggravante. Même lorsque les scarifications sont faites avec des suspensions de BCG concentrées et sont répétées en des points multiples du corps, les cobayes traités n'ont pas plus de lésions que les cobayes témoins. Si une différence existe entre ces deux groupes d'animaux, elle serait plutôt en faveur des cobayes soumis à ce traitement. Ceux-ci, dans certains cas, paraissent avoir une tendance moindre à la généralisation de leurs lésions au foie et aux poumons.

Les mêmes résultats ont été obtenus chez les cobayes vaccinés par la voie cutanée ou la voie sous-cutanée et traités, après leur infection par un bacille tuberculeux virulent, soit par du BCG administré par des scarifications cutanées, soit de la même manière par des bacilles tuberculeux humains tués par la chaleur, soit par du BCG inoculé sous la peau à la dose de 2 milligrammes.

Il n'y a eu, dans ces différents groupes d'animaux traités ni ralentissement, ni activation du processus tuberculeux.

Ces essais expérimentaux n'apportent donc pas la preuve de l'action curative du BCG administré par des scarifications cutanées à des cobayes tuberculeux, mais ils permettent d'éliminer toute crainte sur les incidents que la vaccination par cette méthode pourrait déterminer chez un sujet porteur de lésions tuberculeuses latentes qui seraient restées méconnues.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] BALANESCO (I.), VEBER (T.) et GASPAS (I.). Administration du vaccin BCG par voie buccale chez les adultes allergiques en bon état de santé et chez les tuberculeux pulmonaires. Etude clinique et radiologique. *Rev. Tub.*, 1935, **1**, 1024.
- [2] BALTEANU (I.), TOMA (A.) et GARAGULI (Ana). Essai de vaccination préventive et curative du cobaye à l'aide du vaccin BCG administré par voie digestive. *C. R. Soc. Biol.*, 1935, **113**, 1461.
— Essais de vaccination du cobaye par le BCG. Le BCG utilisé comme moyen curatif dans la tuberculose du cobaye. *Ces Annales*, 1936, **56**, 152.
- [3] COULAUD (E.). Injections sous-cutanées de vaccin BCG chez les

tuberculeux traités et guéris par le pneumothorax bilatéral. *Bull. Acad. Méd.*, 1931, **105**, 703.

- [4] COULAUD (E.) et M^{lle} LÉCUYER (G.). *Rev. Tub.*, 1939-1940, **5**, 1234.
- [5] GOMEZ (Fernando). Sur les effets des inoculations sous-cutanées de BCG chez les malades tuberculeux. *Rev. Tub.*, 1930, **11**, 305.
- [6] KUTSCHERA-AICHBERGEN (Hans). L'action thérapeutique d'une tuberculose de la peau sur la tuberculose des poumons et du larynx. *Klin. Woch.*, 4 septembre 1943, n° 36-37, 566.
- [7] LÉVITAN (J.) et LOKHOFF. Etude anatomo-pathologique des lésions produites chez les cobayes tuberculeux traités par le BCG. *Ces Annales*, 1931, **47**, 484.
- [8] LÉVITAN (J.), LOKHOFF (D.) et KOSMODÉMIANSKI (V.). De l'influence des injections de BCG sur les animaux infectés de tuberculose virulente. *Ces Annales*, 1930, **45**, 740.
- [9] MAENDL (H.) et LICHTWITZ. Unsere Erfahrungen von Calmette'schen Tuberkelbazillen. *Med. Klin.*, 1938, **2**, 1270.
- [10] NÈGRE (L.) et BRETEY (J.). *Vaccination par le BCG par scarifications cutanées*. Masson et C^{ie}, éditeurs, Paris, 1942.
- [11] NÈGRE (L.) et BRETEY (J.). Influence du BCG administré par scarifications cutanées sur l'évolution de la tuberculose du cobaye. *C. R. Soc. Biol.*, 1943, **137**, 633.
- [12] NÈGRE (L.) et VALTIS (J.). Contribution à l'étude expérimentale du bacille bilié de Calmette et Guérin. *Ces Annales*, 1932, **49**, 595.
- [13] RADOSSAVLÉVITCH, STANOYÉVITCH (M^{me}), KOSTITCH-YOKSICH (M^{me}), RANKOVITCH, NÉDELKOVITCH, SPOUJITCH et MOURITCH. Vaccination préventive et essais de traitement de la tuberculose par le BCG. *Ces Annales*, 1931, **46**, 178.
- [14] SORGO (Josef). Ueber die Behandlung der Lungentuberkulose durch intrakutane Einverleibung der Calmette'schen Tuberkelbazillen (Stammen BCG). 12 Tagung d. Deutsch. Verein f. Mikrobiol., in *Centralbl. Bakt. I*, 1927, **104**, 72. *Mediz. Klinik.*, 1927, n° 34, 1292.

LES AGRESSINES BACTÉRIENNES ET LEUR ACTION FAVORISANTE SPÉCIFIQUE SUR L'INFECTION (*)

par A. BOIVIN et A. DELAUNAY.

Depuis une quarantaine d'années, les discussions ont été nombreuses autour de l'existence même et des propriétés des « agressines » de Bail, de ces substances à action favorisante sur l'infection que pourraient produire les bactéries pathogènes. Divers principes présents dans les filtrats des cultures sur bouillon, comme par exemple les leucocidines qui tuent les polynucléaires, les hyaluronidases (facteurs de diffusion) qui frayent un chemin aux bactéries dans les espaces conjonctifs et les exotoxines nécrosantes qui offrent des zones dévitalisées à la pullulation des bactéries et spécialement des germes anaérobies, ont certainement quelque action agressive. Mais, ainsi que nous l'avons montré dans des publications récentes (1), il est un constituant de maintes cellules bactériennes, leur antigène somatique toxique (antigène glucido-lipidique), qui présente à un haut degré les propriétés des agressines. Incapables d'exercer une action nocive sur les leucocytes qui ne sont atteints ni dans leur motilité ni dans leur pouvoir phagocytaire (2), les antigènes glucido-lipidiques entravent cependant la diapédèse des globules blancs, c'est-à-dire leur sortie hors des vaisseaux au niveau des tissus infectés. Par là-même ils jouent un rôle favorisant sur le déroulement des infections qui ne montre aucun caractère de spécificité. C'est ainsi, par exemple, qu'on peut voir un antigène de colibacille faciliter la pullulation des *Salmonella* (*S. typhi-murium*, etc.) ou encore du bacille du charbon, chez la souris.

Certains auteurs (Rosenow, Tchistovitch et Yourevitch, Dudgeon et ses collaborateurs, etc.) ont cru pouvoir ramener les agressines de Bail à des antiopsonines, qui exerceraient leur

*Note présentée à la séance du 2 mars 1944 de l'Association des Microbiologistes de Langue française.

(1) A. BOIVIN et A. DELAUNAY. *C. R. Soc. Biol.*, 1942, **136**, 704 et 1943, **137**, 585 ; *Bull. Acad. Méd.*, 1943, **127**, 274 ; *Rev. Immunol.*, 1942, **7**, 193, et 1943 (sous presse).

(2) A. DELAUNAY. *C. R. Soc. Biol.*, 1942, **136**, 729 et 1943 (sous presse) ; *Rev. Immunol.*, 1942, **7**, 208.

action pro-infectieuse en neutralisant spécifiquement les opsonines correspondantes. En fait, depuis lors, diverses observations sont venues révéler la possibilité, pour le polysaccharide d'un type donné de pneumocoque, d'exercer *in vitro* une action anti-opsonique à l'égard de ce type (Sia, Ward, Enders, etc.) et *in vivo* une action favorisante sur l'infection, par ce même type, des sujets immunisés (Felton).

L'anticorps (anticorps O) correspondant à un antigène glucido-lipidique (antigène O) n'étant rien d'autre que l'opsonine valable contre le germe considéré, nous devons nous demander si un tel antigène ne pourrait pas ajouter quelque effet agressif spécifique à l'effet agressif non spécifique, dont nous avons antérieurement démontré la réalité et l'importance. Comme on va le voir, l'expérience a prouvé le bien-fondé de notre attente.

Un antigène glucido-lipidique est doué d'une action antiopsonique spécifique, qu'il est aisé de mettre en évidence par une expérience intégralement conduite *in vitro*. Mélangeons, par exemple, une suspension de B. typhiques smooth vivants (souche possédant seulement l'antigène O classique du B. d'Eberth), un immunosérum renfermant l'anticorps O correspondant et un exsudat péritonéal riche en polynucléaires (cobaye préparé avec du bouillon), puis abandonnons le tout à 37° : la phagocytose se poursuit très activement par suite de l'effet opsonisant spécifique de l'anticorps O. Réalisons, d'autre part, un témoin contenant seulement les bactéries et l'exsudat : en l'absence d'anticorps, la phagocytose se déroule lentement. L'adjonction d'antigène glucido-lipidique O du B. d'Eberth diminue beaucoup l'effet opsonisant de l'immunosérum, alors qu'elle ne perturbe en rien la lente phagocytose sans sérum ; dans le premier cas, en effet, une concurrence s'établit, pour la fixation de l'anticorps O, entre les corps bactériens (sensibilisation à la phagocytose) et l'antigène libre amené en solution (précipitation). Si on laisse préalablement en contact, durant quelques minutes à 37°, l'immunosérum et l'antigène, avant de les mélanger aux bactéries et aux polynucléaires, on ne trouve plus trace d'effet opsonisant : l'antigène (employé en excès) s'est combiné à l'anticorps et il ne reste plus d'anticorps libre pour opsoniser les bactéries. Notons que des constatations tout à fait analogues peuvent être faites en suivant au microscope non plus la phagocytose des bactéries par les leucocytes, mais leur simple agglutination sous l'action de l'anticorps O. L'adjonction d'antigène O au mélange bactéries + immunosérum gêne l'agglutination sans l'abolir (concurrence pour la fixation de l'anticorps) ; le contact préalable de l'antigène (excès) et de l'immunosérum supprime tout pouvoir agglutinant (neutralisation totale de l'anticorps, par combinaison).

Après cela, on ne peut douter qu'*in vivo* un antigène glucido-lipidique doive doubler d'une action agressive spécifique (neutralisation de l'opsonine) son action agressive non spécifique (entrave à la diapédèse des leucocytes). Mais il ne paraît guère possible d'obtenir, à l'état pur, la manifestation de la première de ces deux actions. La difficulté peut être tournée en recourant non plus à un antigène mais à l'haptène polysaccharidique correspondant, dépourvu de toute toxicité et de tout pouvoir inhibiteur sur la diapédèse, mais aussi capable que l'antigène de se combiner spécifiquement à l'anticorps O. On sait qu'un tel haptène s'obtient en soumettant l'antigène au chauffage en milieu faiblement acide. Voici l'expérience que nous avons instituée et qui nous a permis de contrôler l'existence d'un effet agressif spécifique, lié à la neutralisation, *in vivo*, de l'anticorps opsonisant.

Des souris blanches (20 g.) sont vaccinées par 6 injections intrapéritonéales d'antigène glucido-lipidique du B. d'Aertryck (doses s'échelonnant de 0,001 mg. à 0,050 mg. ; 2 injections par semaine). Une semaine après la dernière injection vaccinante, elles sont infectées expérimentalement par inoculation, dans la veine, de 30.000 B. d'Aertryck vivants (souche de virulence moyenne). Deux lots sont faits parmi les animaux. Les souris du premier lot ne subissent plus aucun traitement. A chacun des animaux du second lot on injecte dans le péritoine, 1 mg. d'haptène du B. d'Aertryck et l'on répète cette injection les quatre jours suivants (chaque souris de ce lot reçoit ainsi, au total, 5 mg. d'haptène). Des animaux témoins (non vaccinés) sont infectés de même et sont également divisés en deux lots, dont l'un seulement reçoit les 5 mg. d'haptène. Tous les animaux sont suivis pendant vingt jours après l'inoculation infectante. Le tableau ci-dessous résume nos constatations :

	NOMBRE de souris infectées	SOURIS survivantes
<i>Animaux vaccinés :</i>		
Sans administration d'haptène.	27	18
Avec administration d'haptène.	25	3
<i>Témoins :</i>		
Sans administration d'haptène.	26	2
Avec administration d'haptène.	26	0

L'effet agressif de l'haptène sur les animaux vaccinés, est donc évident.

En conclusion, un antigène glucido-lipidique exerce une action favorisante sur les infections qui relèvent d'un double mécanisme :

1° D'un mécanisme non spécifique : effet inhibiteur général de l'antigène sur la diapédèse, ayant pour conséquence d'empêcher l'afflux des leucocytes aux points infectés par des bactéries quelconques ;

2° D'un mécanisme spécifique : effet neutralisant sur l'anti-

corps O — sur l'opsonine — répondant à la bactérie d'où provient l'antigène ; mais, de toute évidence, cet effet ne peut se manifester que pour autant que le sujet est doué d'une certaine immunité à l'égard de la bactérie infectante (immunité succédant à une infection apparente ou occulte ou immunité consécutive à une vaccination).

L'antigène glucido-lipidique, que libère un germe au sein de l'organisme infecté, ne peut donc que favoriser la pullulation de ce germe *in vivo*, en apportant, et cela de deux façons différentes, une entrave aux défenses phagocytaires. Il y a là une action nocive importante des antigènes glucido-lipidiques, qui s'ajoute à celles qu'on connaissait déjà et qui faisaient des antigènes en question les « endotoxines » des bactéries, endotoxines capables de congestionner les viscères et d'altérer l'endothélium des capillaires en déclenchant de nombreuses hémorragies microscopiques, d'altérer gravement la muqueuse intestinale, de troubler profondément la régulation glycémique, lactacidémique, etc.

LE POTENTIEL D'OXYDO-REDUCTION AU COURS DE LA RÉGÉNÉRATION DES MILIEUX EMPLOYÉS POUR LA CULTURE DES ANAÉROBIES

par MARCEL RAYNAUD et Max VISCONTINI.

(Institut Pasteur, Service des anaérobies [D^r PRÉVOT]
et Service de Chimie biologique [D^r MACHEBOEUF].)

Le concept d'anaérobiose a subi au cours des vingt dernières années une évolution importante. A la notion de toxicité de l'oxygène moléculaire s'est substituée celle d'intensité réductrice optimale : un germe anaérobie strict est un microorganisme qui réclame, pour sa croissance, une certaine intensité réductrice du milieu environnant. Cette intensité réductrice, à la suite des travaux de M. Clark et de ses collaborateurs [1], s'exprime actuellement par une différence de potentiel et se représente par le symbole E_h . Chaque germe, de même qu'il ne se développe que dans un certain intervalle de température ou de pH, ne croît qu'entre certaines limites de E_h . Les aérobies stricts ne poussent que dans une zone élevée de E_h , les anaérobies stricts dans une zone basse, les anaérobies facultatifs dans les deux régions. D'une façon plus précise, quoique non absolue, les germes rangés dans le groupe des anaérobies, tel qu'il était antérieurement défini — à savoir l'ensemble des microorganismes qui ne poussent pas sur les milieux ordinaires de la bactériologie en présence d'air — sont ceux dont le E_h de croissance a pour limite supérieure : — 0,070 v. à pH = 7,1 et 37°, d'après Aubel, Aubertin et Genevois [2]. La limite inférieure de croissance de ces germes est, d'après les mêmes auteurs, — 0,436 v. Cette limite inférieure est très basse, si bien qu'il est exceptionnel que la croissance des anaérobies soit conditionnée par elle. En pratique, seule intervient comme facteur réductif la limite supérieure. Ces notions semblent bien établies. Elles reposent sur de nombreux résultats expérimentaux et sont complètement indépendantes des interprétations que l'on peut donner du mécanisme physico-chimique qui les conditionne.

Les procédés classiques de culture anaérobie, empiriquement réglés avant que ne soient connus les faits précédents, ont seule-

ment pour effet d'amener les milieux utilisés à un E_h favorable à la croissance. Ces procédés peuvent être groupés en deux grandes catégories : les uns comportent l'addition aux milieux de culture, de substances réductrices, les autres sont basés sur l'exclusion de l'air des milieux de culture. L'extraction des gaz dissous dans le liquide a pour effet de « révéler » le caractère réducteur propre de ces milieux, caractère masqué auparavant par la présence d'oxygène moléculaire dont l'action antagoniste vis-à-vis des substances réductrices naturelles du milieu empêche le départ de la culture. On réalise, dans la pratique courante, l'élimination de l'air par un chauffage préalable ; cette opération, à laquelle on donne le nom de « régénération », s'effectue en maintenant les tubes de milieu au bain-marie bouillant, pendant un temps variant, selon les expérimentateurs, de dix minutes à une demi-heure ou même davantage.

L'étude du potentiel d'oxydo-réduction des géloses profondes glucosées a été faite par A.-R. Prévot [3], par la méthode des indicateurs colorés. Cet auteur a montré qu'après chauffage et solidification par refroidissement rapide, le r_h , qui s'établit dans la gélose profonde, pendant les quelques jours qui suivent immédiatement ces opérations, varie avec la profondeur, mesurée à partir de la surface libre. A.-R. Prévot a établi ainsi que la disposition des colonies microbiennes en gélose profonde est fonction du r_h -limite de croissance des germes envisagés.

Dans le cas particulier de la culture des Spirochètes, R. Vincent et R. Daufresne [4] ont fait la mesure potentiométrique du E_h d'un milieu gélosé. En raison de ces travaux antérieurs, nous ne nous occuperons pas des milieux solides.

La méthode de régénération appliquée au milieu liquide permet la culture de la plupart des anaérobies courants en bouillon glucosé, la surface libre restant en contact avec l'atmosphère. Il suffit pour cela que le rapport entre l'aire de la surface libre et le volume total de liquide exprimés dans le même système d'unité soit assez faible, de l'ordre de 1/10 ; c'est là le procédé classique de culture dite en « tube profond ».

On admet couramment que la régénération a uniquement pour effet de chasser l'oxygène dissous et c'est sur cette base théorique que le procédé a été réglé. Est-ce bien là le seul mécanisme qui se produit ? Ne se fait-il pas, lors du chauffage préalable, une transformation chimique au cours de laquelle apparaissent, dans le milieu, des corps nouveaux qui viennent modifier son pouvoir réducteur propre ?

Tel est le problème que nous avons étudié. Nous exposons les recherches auxquelles il nous a conduits et les résultats que nous avons obtenus à l'aide des techniques suivantes :

1° MESURE DU POTENTIEL D'OXYDO-RÉDUCTION.

Les milieux de culture répartis sous des volumes variables dans des récipients usuels, tubes à essai, fioles coniques, sont régénérés, soit par chauffage au bain-marie bouillant pendant une demi-heure (tubes à essai), soit par passage à l'autoclave ouvert (grandes fioles coniques). Ils sont ensuite refroidis en les entourant de glace, ou d'eau froide. On suit la température avec un thermomètre placé dans le milieu et préalablement stérilisé. Lorsqu'elle est un peu au-dessus de 38° C, on remplace le tampon d'ouate qui assurait la fermeture des récipients par un bouchon en caoutchouc stérile, percé d'un certain nombre de trous, par où passent les éléments nécessaires à la mesure, à savoir :

1° l'électrode : fil de platine brillant, soudé au fond d'un mince tube de verre, qui contient du mercure pour assurer la connexion électrique.

2° le pont de KCl. : solution de KCl. saturée gélosée à 2 p. 100.

3° suivant les cas, deux tubes, l'un plongeant profondément dans le liquide pour l'arrivée des gaz, l'autre très court pour leur départ.

Le demi-élément milieu-électrode en platine brillant est associé à un demi-élément constitué par une électrode de calomel. Le tout est placé à l'étuve à 37°.

La force électro-motrice de la pile ainsi formée est mesurée par la méthode d'opposition avec un potentiomètre du type Carpentier. L'appareil de zéro est un galvanomètre à cadre mobile, sensible à 10^{-8} ampère. En faisant des mesures tous les quarts d'heure environ et en prenant la précaution de ne faire passer le courant que pendant le temps très court nécessaire aux lectures, la polarisation qui se produit lorsque la pile débite est pratiquement négligeable.

Le potentiel d'oxydo-réduction est donné par la formule algébrique suivante, à 38° :

$$E_h = 0,236 + E \text{ mesurée.}$$

E mesurée est affectée du signe + lorsque l'électrode en platine est positive par rapport à l'électrode au calomel. Elle est affectée du signe — dans le cas contraire. Pour l'étude théorique du potentiel d'oxydo-réduction nous renvoyons aux ouvrages classiques [5].

2° DÉTERMINATION DU E_h -LIMITE.

D'une façon générale, le principe de la détermination du E_h limite consiste à suivre la variation du E_h en fonction de la durée d'une certaine action physique destinée à assurer l'éviction de

l'air du milieu de culture. Jusqu'ici trois procédés ont été utilisés :

- a) Maintien sous une couche de vaseline.
- b) Courant d'azote à travers le milieu.
- c) Emploi du vide.

a) La première méthode repose sur l'observation ancienne que la présence d'une couche de vaseline à la surface du milieu assure l'anaérobiose du liquide sous-jacent. Dubos [6], en suivant, par des mesures colorimétriques, le E_h du bouillon non glucosé, régénéré, refroidi et placé sous vaseline, a trouvé une baisse progressive du potentiel d'oxydo-réduction en fonction du temps. Le E_h tend lentement vers une limite qui n'est atteinte qu'en sept jours. Dubos a montré, en même temps, fait déjà connu par ailleurs, que l'anaérobiose assurée par ce dispositif n'est que relative, car la diffusion de l'oxygène se fait à travers la couche de vaseline et entraîne une recoloration de la zone superficielle du milieu. La lenteur de l'établissement du E_h limite, dans ces conditions, permet de penser que les substances réductrices responsables ne sont contenues qu'en faible quantité dans le milieu et ont un effet de « capacité » (capacity effect) très faible. Par ailleurs, la vaseline étant perméable à l'air, le E , terminal est certainement supérieur au E_h limite vrai du milieu et correspond seulement à un certain état d'équilibre entre l'air qui pénètre par diffusion et les substances réductrices. Nous n'avons pas utilisé cette technique en raison de son inefficacité relative confirmée par les expériences de Boyd et Reed [7] qui ont trouvé que par barbotage à travers le milieu d'azote purifié, on obtenait une valeur du E_h -limite toujours plus basse que par maintien sous une couche de vaseline.

b) L'emploi du courant d'azote comme moyen de désaération dans l'étude du E_h est dû à J.-B. Coulter [8] qui a montré qu'en faisant passer de l'azote purifié à travers un milieu de culture, on observait une baisse du E_h qui tend, assez rapidement, en cinq à six heures, vers une limite. Cette limite correspond à l'intensité réductrice propre du milieu. Dans leur travail déjà cité [7] Boyd et Reed ont confirmé ce fait et montré, de plus, que le passage de l'azote ne provoque aucun phénomène électrique supplémentaire. L'azote, en effet, ne donne pas avec le platine de potentiel gaz-métal, comme on en observe avec l'hydrogène.

c) La technique de désaération par le vide a été plus rarement employée pour les mesures du potentiel d'oxydo-réduction, en raison des difficultés supplémentaires qu'elle présente. La gélose du pont de KCl ne résiste, en effet, que pendant un temps limité à la force créée par le vide. Plotz et Geloso [9] ont tourné la difficulté par l'emploi d'un dispositif particulier, pour la description duquel, nous renvoyons à l'article original. Le pont de KCl est remplacé par une couche d'électrolytes absorbée le long des parois du tube et la F. E. M. de la pile de concentration ainsi formée

serait négligeable, de l'ordre de 0,030 v., d'après les auteurs. Nous avons préféré le dispositif suivant (fig. 1). Le bouillon, sous le volume de 50 cm³, est contenu dans un tube de diamètre assez fort : 3 cm. On remplace le bouchon d'ouate par un bouchon stérile en caoutchouc percé de trous par où passent l'électrode, le

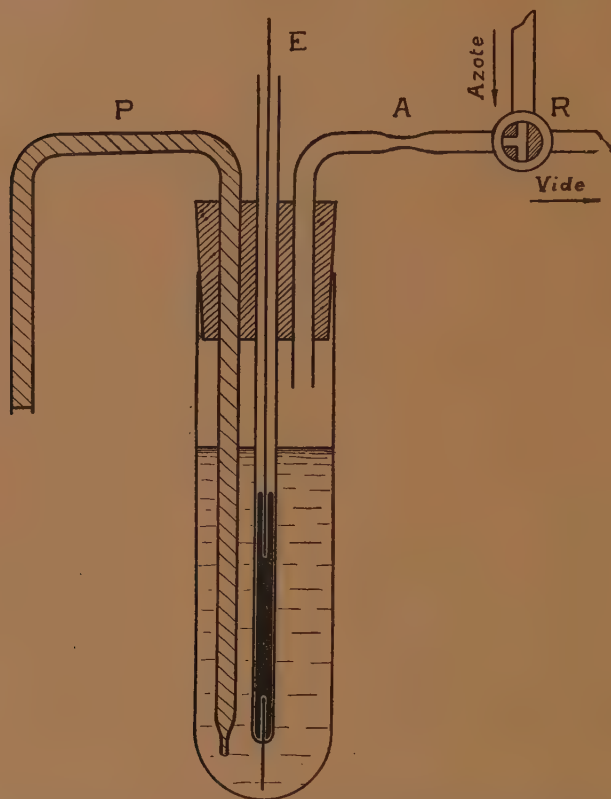


FIG. 1. — Tube servant à faire les mesures de [E] en atmosphère confinée d'azote, après action du vide. A, partie effilée soudée après remplissage d'azote; E, électrode de platine brillant; P, pont gélifié de KCl saturé; R, robinet à trois voies.

pont de KCl et un tube contenant entre deux étranglements un petit tampon de coton. Par ce tube on peut alternativement faire le barbotage dans du pyrogallate de potassium. On fait le vide jusqu'à ce que le liquide se mette à bouillir. L'ébullition est maintenue une à deux minutes. On fait ensuite entrer de l'azote. On recommence cinq fois de suite l'opération. Finalement on laisse le récipient rempli d'azote à une pression très légèrement supérieure à la pression atmosphérique et on scelle le tube d'arrivée au

niveau de son effilure. Le pont de KCl. n'est ainsi soumis à l'action du vide que pendant un temps très court. La diffusion du KCl. dans le milieu est négligeable. L'étanchéité de l'appareil est d'autant plus facile à assurer que l'atmosphère qui surmonte le liquide est composée d'azote à une pression supérieure à la pression atmosphérique.

MILIEUX ÉTUDIÉS.

1° Eau Glucosée à 1 p. 100. — a) Solution de glucose à 1 p. 100 dans l'eau distillée à pH 6,8 (fig. 2, courbe I).

b) Solution de glucose à 1 p. 100 dans de la soude N/10 (fig. 2,

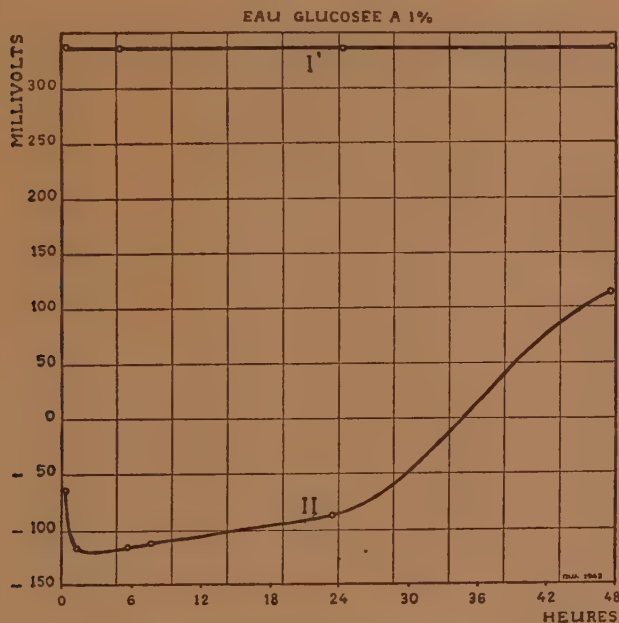


FIG. 2. — Ces deux courbes illustrent les différences que présentent la régénération d'une solution glucosée en milieu neutre à pH 6,8 (courbe du haut) et la même régénération en milieu alcalin, NaOH N/10 (courbe du bas).

courbe II). La régénération dans ce milieu très alcalin, s'accompagne d'une caramélisation marquée. On neutralise ensuite jusqu'à pH 7.

On sait en effet que le potentiel d'oxydo-réduction dépend, entre autres facteurs, du pH et de la température. Les mesures effectuées à pH constant, permettent d'éviter des corrections que l'on ne peut calculer que dans le cas de systèmes théoriques simples, mais non dans celui d'un système aussi complexe que le bouillon.

Beaucoup d'expérimentateurs n'ont pas cherché à séparer ces deux facteurs :

pH de régénération.

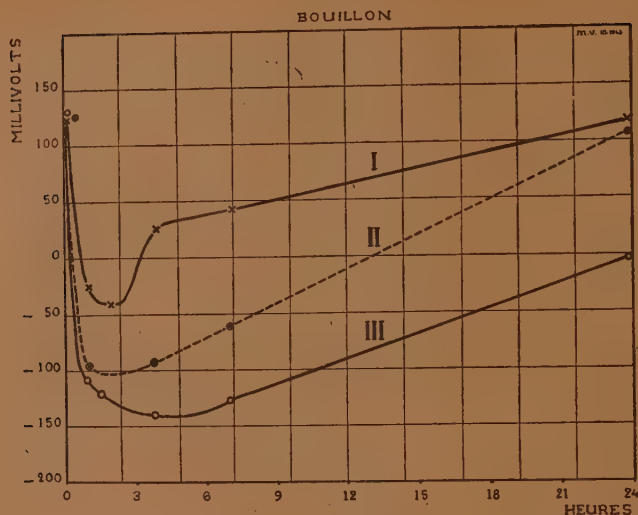


FIG. 3. — La courbe I est obtenue après régénération par chauffage de 800°c.c. de bouillon ordinaire non glucosé dans un Erlenmeyer. La courbe II représente la même expérience pour 800 c.c. de bouillon glucosé à 1 p. 100. La courbe III représente la même expérience pour 800 c.c. de bouillon glucosé à 10 p. 100.

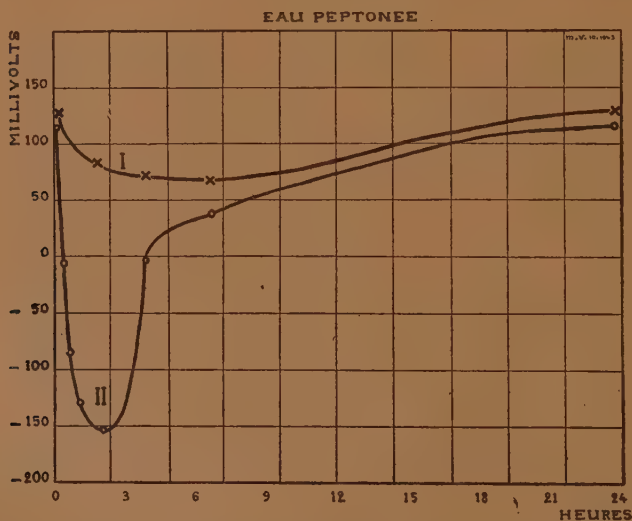


FIG. 4. — La courbe I est obtenue après régénération par chauffage de 800 c.c. d'eau peptonée ordinaire non glucosée, dans un Erlenmeyer. La courbe II représente la même expérience pour de l'eau peptonée à 1 p. 100.

pH de mesure.

Ils ont ajusté les milieux de culture à un pH déterminé. Ils ont ensuite procédé à la stérilisation de ces milieux et mesuré le E_h . Les courbes E_h — pH qu'ils obtiennent sont donc des courbes complexes où les deux facteurs envisagés plus haut interviennent.

2° *Bouillon*. — Le bouillon utilisé est un mélange, à parties égales, de bouillon viande-foie [10] et de bouillon-placenta [11].

Bouillon viande-foie : Produit de la digestion pepsique de chair musculaire et de foie, ramené à pH 7,2, précipité à 110° pendant une demi-heure. On ajoute ou non, suivant les cas, 1 p. 100 de glucose et l'on stérilise aux environs de 109°, sans atteindre jamais 110°. Le pH terminal est voisin de 7.

Bouillon-placenta : Milieu analogue au précédent, dans lequel du placenta de femme seul a été soumis à la digestion pepsique.

Les milieux suivants, à base de bouillon, ont été étudiés :

a) Bouillon sans glucose additionnel (fig. 3, courbe I).

b) Bouillon glucosé à 1 p. 100 (fig. 3, courbe II).

c) Bouillon glucosé à 10 p. 100 (fig. 3, courbe III).

3° *Eau peptonée à 10 p. 100 et salée* (NaCl, 5 p. 1.000). — a) Sans glucose (fig. 4, courbe I).

b) Glucosée à 1 p. 100 (fig. 4, courbe II).

RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX.

Avant d'exposer nos propres résultats, nous rappellerons ceux de quelques expérimentateurs antérieurs :

R. Dubos (1929) [6]. Bouillon non glucosé, régénéré puis placé en anaérobiose sous vaseline. pH 7,8.

E_h -limite = — 0,180 v., méthode colorimétrique : réduction complète de l'indigodisulfonate.

P. Filders (1929) [12] :

Eau peptonée.	0,020 v.	pH = 7,5
Bouillon ordinaire	0,140 v.	pH = 7,7
Bouillon glucosé	0,200 v.	pH = 7,6
(méthode colorimétrique).		

Les résultats ci-dessous ont été obtenus par des mesures potentiométriques :

J. B. Coulter (1929) [8]. Bouillon non glucosé. Courant d'azote.

E_h -limite = — 0,050 v à — 0,060 v.

J. B. Coulter et M. L. Isaacs (1929) [13]. — 0,085 v. à — 0,095 v. milieux et techniques analogues aux précédents.

B. C. Knight [14]. Bouillon non glucosé, tamponné, courant d'azote.

pH = 4,25	E_h — limite = + 0,070 v.
pH = 7,02	E_h — limite = — 0,083 v.
pH = 9,30	E_h — limite = — 0,190 v.
pH = 10,47	E_h — limite = — 0,258 v.

Nous ne reproduisons ci-dessus que quelques chiffres d'un tableau beaucoup plus complet donné par Knight et relatif à l'influence du pH sur le E_h .

E. Lepper et C. Martin (1930) [5]. Viande hachée cuite ; électrode en iridium.

$$E_h - \text{limite} = -0,170 \text{ v.}$$

Bouillon + fragments de viande, *en présence d'air*.

$$E_h = -0,200 \text{ v.}$$

H. Plotz et Geloso (1930) [9]. Bouillon.

$$\begin{array}{ll} \text{pH} = 7,4 & E_h - \text{limite} = -0,198 \text{ v.} \\ \text{pH} = 9 & E_h - \text{limite} = -0,320 \text{ v.} \end{array}$$

Boyd et Reed (1931) [7]. Bouillon pH = 7,3.

E_h -limite = -0,100 v. lorsque l'anaérobiose est assurée par une couche de vaseline.

E_h -limite = -0,140 v. lorsque la désaération se fait par barbotage d'azote.

Sur un autre échantillon de bouillon — 0,091 v.

Comme on le voit par ce bref rappel des résultats déjà anciens des premières mesures effectuées, les divergences sont importantes entre les auteurs. Elles relèvent principalement, en dehors du pH, de trois facteurs :

- 1° Variation de composition des milieux de culture ;
- 2° Approximation des mesures potentiométriques ;
- 3° Procédé de désaération.

1° La variation de composition des milieux usuels est une des grandes causes de divergence entre les résultats de beaucoup d'expériences bactériologiques. Pour éliminer cette source d'erreurs et rendre nos expériences aussi comparables entre elles que possible, nous avons employé le même lot de préparation pour chaque milieu déterminé.

2° L'influence du deuxième facteur est connue. Elle devrait être négligeable en principe, les mesures potentiométriques, dans un milieu stable se faisant facilement, à moins d'un millivolt près, avec les appareillages couramment employés. Mais, en fait, sur un milieu aussi complexe que le bouillon, de multiples facteurs occasionnels interviennent. Les mesures ne sont reproductibles, sur un même échantillon, qu'avec une approximation qui est de l'ordre de 0,010 à 0,020 v. Nos résultats, sur ce point, concordent avec ceux des auteurs antérieurs.

3° L'influence du troisième facteur a été moins étudiée jusqu'ici. Nous avons voulu l'examiner préalablement. Dans ce but, nous avons déterminé le E_h -limite, dans le vide azoté, d'une part et, dans un courant d'azote, d'autre part.

Par barbotage d'azote, en bouillon glucosé à 1 p. 100 non régénéré, nous avons obtenu, pour le E_h -limite, la valeur de -0,090 v. (fig. 5, courbe I).

Par action du vide azoté, suivant la technique décrite plus haut,

le potentiel de départ est déjà très bas : — 0,0100 v. (fig. 5, courbe I). Le E_h -limite est de — 0,125 v. Il est atteint en un temps relativement court : une heure quinze. Il persiste sans doute, au début, de faibles traces d'oxygène qui sont absorbées peu à peu par les corps réducteurs du bouillon.

Cette valeur est un peu plus basse que celle obtenue par simple courant d'azote, la différence entre les deux chiffres étant indiscutablement supérieure à l'ordre de grandeur des écarts acceptables qui est, nous l'avons déjà dit, de 0,020 v. au maximum. Cette différence s'explique vraisemblablement de la façon suivante. Le volume du liquide employé dans les expériences précédentes est

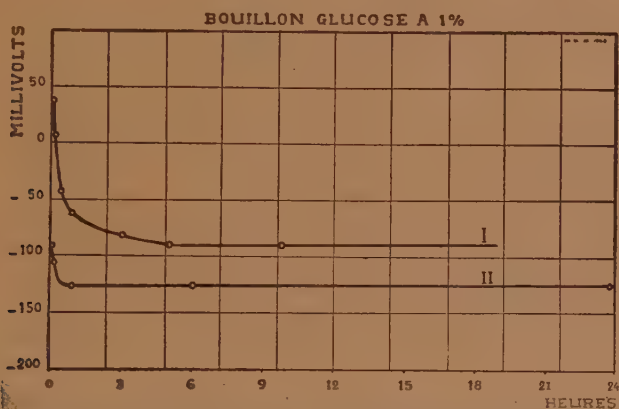


FIG. 5. — La courbe I est obtenue par le passage direct d'un courant d'azote, bulle à bulle dans 50 c.c. de bouillon glucosé à 1 p. 100. La courbe II est obtenue en atmosphère confinée d'azote, sur la même quantité de bouillon.

relativement important : 50 cm³. Pour assurer la désaération, le courant d'azote doit être assez rapide (300 bulles-minute). La purification du gaz, qui se fait par barbotage dans le pyrogallate de potasse, n'est pas complète à cette vitesse et le E_h mesuré est, non pas le E_h -limite vrai du milieu, mais le E_h correspondant à l'équilibre entre les substances réductrices du milieu et une quantité faible certes, mais non nulle, d'oxygène dans le milieu.

Pour vérifier cette hypothèse, nous avons effectué une série de mesures dans les tubes de 14 mm. de diamètre contenant seulement 5 cm³ du même milieu (bouillon glucosé à 1 p. 100). La désaération peut alors être assurée par un courant plus lent (100 bulles-minute). Le E_h -limite s'établit en un temps beaucoup plus court (quinze minutes) et présente une valeur plus basse : — 0,105 v. qui se rapproche davantage de celle obtenue après action du vide azoté (fig. 6, courbe II). Celle-ci reste cependant nettement plus

basse et doit être retenue comme mesure du E_h -limite vrai du milieu étudié, soit $-0,125$ v.

Comparons maintenant à ce chiffre, les valeurs les plus basses obtenues en suivant la variation du E_h en fonction du temps, après régénération (fig. 3). Nous avons trouvé, pour le bouillon glucosé à 1 p. 100 (800 cm³ en Erlenmeyer de 1 l.) $-0,100$ v. environ. Le chiffre est très voisin du E_h -limite vrai.

Donc, au cours de la période qui suit la régénération, le milieu montre, bien que sa surface libre soit au contact avec l'air, une baisse du E_h qui finit par atteindre un minimum voisin du E_h -limite du milieu.

La forme des récipients et le volume du liquide employés, condi-

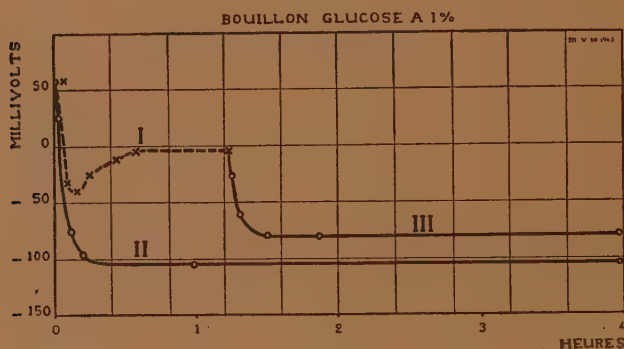


FIG. 6. — La courbe I est obtenue après régénération par chauffage de 5 c.c. de bouillon. La courbe III est obtenue, au cours de la même expérience, par passage d'un courant d'azote, bulle à bulle. La courbe II est obtenue par passage direct d'azote dans 5 c.c. de bouillon.

tionnant le rapport surface-volume, interviennent dans l'allure de la courbe.

La courbe I de la figure 6 rapporte la variation du E_h en fonction du temps dans un tube à essai de 14 mm. de diamètre contenant 5 cm³ de bouillon glucosé à 1 p. 100, régénéré par chauffage comme nous l'avons précédemment décrit. On voit que le minimum atteint n'est pas très bas : $-0,040$ v. Le E_h remonte cependant rapidement. Si on fait passer alors un courant d'azote, on obtient comme valeur limite $-0,090$ v., ce qui montre que le minimum donné par la régénération est ici bien au-dessus du E_h -limite. Cette courbe explique, de façon démonstrative, pourquoi, malgré la régénération préalable, le bouillon glucosé à 1 p. 100, en tubes de 14 mm. et sous le volume de 5 cm³ ne permet pas la culture des anaérobies à l'air libre. Le rapport S/V, de l'ordre de 0,3, est tel que l'effet de la rentrée d'air est considérable et,

qu'à aucun moment, le E_h ne baisse jusqu'à une valeur suffisante pour permettre le développement.

Le même milieu, réparti sous le volume de 800 cm³, dans un Erlenmeyer de un litre (rapport S/V voisin de 0,1) montre une baisse considérable du E_h qui atteint — 0,100 v. (fig. 3, courbe II) et se maintient aux environs de cette valeur pendant quatre heures. Le niveau minimum atteint est assez bas pour permettre la culture des anaérobies qui y poussent, on le sait, effectivement.

Retenons de l'étude de ces deux cas extrêmes, la nécessité, pour comparer les comportements de différents milieux, au cours de la régénération, de les étudier dans des récipients identiques et sous le même volume.

COMPARAISON DE DIVERS MILIEUX.

Les courbes I, fig. 3 (bouillon sans glucose) et I, fig. 4 (eau peptonée sans glucose) montrent que le minimum atteint après régénération est plus bas pour le bouillon simple que pour l'eau peptonée simple.

Eau peptonée.	E_h — minimum = + 0,060 v.
Bouillon simple	E_h — minimum = — 0,040 v.

Aucune de ces valeurs n'est en principe assez basse pour permettre la culture des anaérobies stricts qui ne poussent, en moyenne, qu'au-dessous de — 0,070 v. Mais, cependant, comme certains anaérobies poussent pour des valeurs supérieures à — 0,70 v., ces milieux permettront encore la culture à l'air de ces derniers, surtout si l'on utilise l'action adjuvante d'un inoculum important. Mais, les résultats sont inconstants et variables avec les espèces ; ceci correspond bien aux faits observés. Le bouillon non glucosé, employé dans les conditions déjà précisées (800 cm³ dans un Erlenmeyer de 1 l.) permet, après régénération, la culture à l'air de certains anaérobies assez tolérants, mais non celle des anaérobies très stricts.

La comparaison des courbes I et II de la figure 4 et celle des courbes, I, II, III de la figure 3 montrent l'influence manifeste de l'addition de glucose sur le E_h - minimum atteint après régénération et par là même sur le E_h - limite vrai du milieu.

Au taux de 1 p. 100, le glucose ajouté avant stérilisation permet d'obtenir :

Avec l'eau peptonée, un E_h - minimum de — 0,150 v.

Avec le bouillon, un E_h - minimum de — 0,100 v.

Ces deux valeurs montrent que les milieux ainsi constitués possèdent, après régénération, un E_h compatible avec la croissance des anaérobies stricts, mais le E_h est beaucoup moins stable en eau peptonée qu'en bouillon.

La figure 3 permet de reconnaître l'influence du taux de glucose ajouté, aussi bien sur l'intensité réductrice du milieu que sur sa « capacité ». La baisse en bouillon glucosé à 10 p. 100, est, après régénération, à la fois plus importante et plus durable qu'en bouillon glucosé à 1 p. 100.

Cette action du glucose est bien connue [16, 17]. Elle n'est pas due au pouvoir réducteur propre de cet ose. La courbe I de la figure 2 montre que les solutions de glucose stérilisées, lorsqu'elles ont été chauffées à pH 6,8, ne manifestent, après régénération, aucune tendance à développer un potentiel négatif d'oxydo-réduction. Par contre, lorsque la régénération a été effectuée en

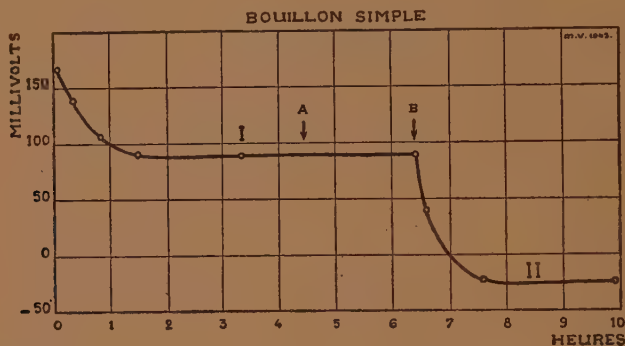


FIG. 7. — La première partie de la courbe est obtenue par le passage direct d'azote, bulle à bulle, dans 5 c.c. de bouillon ordinaire non glucosé. En A, on a ajouté une solution de glucose ordinaire stérilisé, aux environs de la neutralité. En B, on a ajouté une solution stérilisée de glucose légèrement évolué dans la soude N/10.

milieu alcalin (soude déci-normale), on voit (fig. 2, courbe II) qu'il existe dans la solution de glucose ainsi traitée un système oxydo-réducteur qui présente un E_h très bas et un effet de « capacité » marqué, puisque la remontée, sous l'influence de l'air, ne s'effectue que très lentement.

Après régénération, l'addition au bouillon d'une solution de glucose stérilisée à part, en milieu non alcalin ne modifie pas le E_h du milieu (fig. 7, courbe I), tandis que l'addition à ce même bouillon de quelques centimètres cubes d'une solution de glucose très légèrement « évolué » dans une solution de soude N/10 abaisse le E_h du milieu à $-0,030$ v. (fig. 7, courbe II).

Le glucose n'agit donc pas par son pouvoir réducteur propre, mais par l'action des corps réducteurs résultant de sa décomposition. Celle-ci ne se produit, en solution aqueuse pure, que pour un pH nettement alcalin. Dans l'eau peptonée ou dans le bouillon, elle s'effectue à un pH voisin de la neutralité. On comprend donc

que le glucose ne favorise la culture des anaérobies à l'air libre que s'il est introduit dans le milieu avant stérilisation ou régénération.

Le glucose et ses produits de transformation ne sont pas les seuls corps réducteurs présents dans les milieux de culture. D'autres substances ont été considérées comme responsables du pouvoir réducteur propre de ces milieux. Dans le cas des bouillons additionnés de fragments de viande, E. Lepper et C. Martin [15] ont fait intervenir les lipides non saturés, qui fixeraient l'oxygène moléculaire et qui réagiraient ensuite avec le système hémochromogène-hématine. Le plus souvent, on estime que les corps sulphydrylés des protides, en particulier les systèmes cystéine-cystine et glutathion réduit-glutathion assument la plus grande partie du pouvoir oxydo-réducteur des milieux de culture. Les expériences que nous avons rapportées permettent de limiter la part que ces systèmes peuvent éventuellement prendre à l'établissement du E_h propre du milieu. Quand on n'ajoute pas de glucose à ce dernier, le E_h -minimum est beaucoup plus élevé que lorsque le même milieu a été additionné de glucose avant régénération.

	SANS GLUCOSE	AVEC GLUCOSE
Eau peptonée	+ 0,060 v.	— 0,450 v.
Bouillon	— 0,040 v.	— 0,100 v.

En admettant que le pouvoir réducteur du bouillon simple non glucosé soit dû uniquement aux substances autres que le glucose (ce qui ne constitue qu'une approximation, dans le cas du bouillon, car ce dernier contient toujours du glucose provenant du muscle, foie ou placenta, servant à sa préparation), on voit que l'addition de glucose, avant régénération, exerce une influence considérable, beaucoup plus importante que celle de l'ensemble des autres corps réunis, aussi bien en ce qui concerne l'intensité réductrice des milieux de culture que leur résistance à l'oxydation. Cette action est due, non pas au glucose lui-même, mais aux substances qui résultent de sa décomposition sous l'influence de la chaleur en milieu alcalin et qui ne persistent sous leur forme réduite que pendant un temps assez court, après le chauffage des milieux.

3° CONCLUSIONS.

1° Le E_h -limite des milieux de culture liquides peut être déterminé par une méthode combinant l'action du vide et celle de l'azote. Il s'établit par cette technique, dans un délai assez court, de l'ordre de une heure.

2° Pour le mélange à parties égales de bouillon viande fraîche + bouillon placenta, glucosé à 1 p. 100, le E_h -limite a été trouvé égal à — 0,125 v.

3° Le passage d'azote bulle à bulle, à travers le milieu, assure une désaération toujours plus lente et qui reste incomplète si l'azote n'est pas débarrassé de toute trace d'oxygène.

4° Après chauffage préalable et refroidissement consécutif, le E_h des milieux liquides, dont la surface libre est maintenue au contact de l'air passe par un minimum. La valeur de ce minimum varie suivant le rapport de la surface libre au volume total du liquide (S/V). Pour des valeurs élevées de ce rapport, de l'ordre de 0,3, cette valeur minima est de $-0,040$ v (bouillon glucosé), pour des valeurs plus faibles, de l'ordre de 0,10, le minimum atteint se rapproche du E_h -limite du milieu : $-0,100$ v (bouillon glucosé).

5° L'addition de glucose au milieu avant le chauffage produit, après la régénération, une baisse du minimum du E_h , comme le montre le tableau suivant :

	E _h MINIMUM AU CONTACT DE L'AIR	
	sans glucose	avec glucose
Eau peptonée	+ 0,060 v.	- 0,140 v.
Bouillon	- 0,040 v.	- 0,100 v.

6° Cette action du glucose ne s'observe pas si cet ose, stérilisé séparément en milieu non alcalin, est ajouté au milieu après le chauffage de celui-ci.

7° L'effet-tampon d'oxydo-réduction est d'autant plus marqué que la quantité de glucose, ajoutée avant régénération, a été plus importante.

8° Le glucose agit, non par son pouvoir réducteur propre mais par celui des substances qui résultent de sa décomposition sous l'influence de la chaleur et au contact du bouillon.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] CLARK et collaborateurs, Publ. Health Report of the U. S. A. Publ. Health Service 1923-1926. *Hygiène Laboratory Bulletin*, n° 151 ; *Publ. Health Rep. supplement*, 1926, n° 55.
- [2] AUBEL, AUBERTIN et GENEVOIS. *Ann. Phys. et Physic. Chim. Biol.*, 1929, 5, 1.
- [3] PRÉVOT (A. R.). *Bull. Soc. Philomatique*, 1938, 121, 80.
- [4] VINCENT (R.) et DAUFRESNE (R.). *C. R. Soc. Biol.*, 1938, 128, 770.
- [5] WURMSER (R.). *Oxydation et Reduction*. 1 vol., Paris. Presses Universitaires, 1930. — HEWITT. *Oxidation-Reduction potential in Bacteriology and Biochemistry* 4^e édition, London, 1936.
- [6] DUBOS (R.). *J. Exp. Med.*, 1929, 49, 507.
- [7] BOYD and REED. *Can. J. Res.*, 1931, 4, 54.
- [8] COULTER (J. B.). *J. Gen. Phys.*, 1928, 12, 189.
- [9] PLOTZ et GELOSO. *Ces Annales*, 1930, 45, 613.
- [10] STICKEL et MEYER (milieu viande-foie). *J. Inf. Dis.*, 1918, 23, 68.

- [11] PRÉVOT, TAFFANEL et RAYNAUD. (Bouillon-placenta). *Ass. Microbiol. de l. fr.*, 1^{er} juillet 1943.
- [12] FILDES (P.). *Brit. J. Exp. Path.*, 1929, **10**, 151.
- [13] COULTER (J. B.) et ISAACS (M. L.). *J. Exp. Med.*, 1929, **49**, 711.
- [14] KNIGHT (B. C.). *Biochem. J.*, 1930, **24**, 1066.
- [15] LEPPER (E.) et MARTIN (C.). *Brit. J. Exp. Path.*, 1930, **11**, 137.
- [16] PLOTZ (H.). *C. R. Soc. Biol.*, 1930, **103**, 591.
- [17] WURMSER (R.) et GELOSO. *J. Chim. Phys.*, 1928, **25**, 641 ; 1929, **26**, 424 ; 1931, **28**, 260.

AFFINITÉS DES PROTÉIDES POUR LE CUIVRE

par M. MACHEBOEUF et M. VISCONTINI.

(Institut Pasteur, Service de Chimie biologique.)

Si l'on place du sérum sanguin dans un dialyseur en collodion et que l'on plonge ce dialyseur dans une solution très diluée de cuivre (2 mg. de cuivre par litre, par exemple), le contenu du dialyseur prend progressivement une teinte verdâtre et des quantités importantes de cuivre s'y accumulent à la longue, comme si les protéides étaient capables de capter le métal, même lorsqu'il n'est présent qu'à très faible concentration. L'intérêt de ce phénomène nous semble grand, étant donné ce que l'on sait sur le captage de certains ions par les radicules ou les myceliums et sur l'influence de très faibles quantités de ces ions sur les végétaux. Ce problème a, d'autre part, des accointances avec la question très générale des affinités des protéides.

Pour montrer l'importance du phénomène de captage de certains ions par les végétaux, il nous suffit de rappeler que Raulin a déjà vu depuis fort longtemps que le *Sterigmatocystis nigra* est très sensible à l'action toxique de quantités infimes de sels d'argent, de mercure, de plomb ou de cuivre. Plus tard, Devaux [1], après avoir étudié la fixation de traces de plomb par certaines algues, signala des phénomènes identiques pour le cuivre, tandis que Coupin [2], Deherain et Demoussy [3], précisaient l'action de ce même métal sur les végétaux inférieurs. À la dilution de 1/700.000.000, le sulfate de cuivre est encore capable d'entraver le développement des racines des graines de blé ou de lupin. Tous ces auteurs s'accordent pour dire que le cuivre agit plus particulièrement sur le protoplasme des jeunes cellules des radicules, mais sans donner plus d'explications sur le processus chimique de cette action. Comment ne pas faire le rapprochement entre la fixation d'infimes quantités de cuivre par les végétaux et le captage du cuivre par les protéides du sérum sanguin placé dans le dialyseur ? Il s'agit très probablement de phénomènes analogues dont l'étude, dans le cas relativement facile du sérum, peut éclairer le cas général.

TECHNIQUES EXPÉRIMENTALES. — Nous avons utilisé du sérum de cheval normal, dans lequel nous avons au préalable dosé la quan-

tité de cuivre présente spontanément. Nos dialyseurs en collodion, munis d'un dispositif de contre-pression équilibrant l'endosmose, étaient préparés suivant la technique habituelle de notre laboratoire [4]. Les dosages de cuivre ont été effectués colorimétriquement par deux techniques : 1° Lorsque les quantités de cuivre étaient suffisantes, par détermination électrophotométrique de la couleur bleue donnée par l'ammoniaque ; 2° Lorsque la quantité de cuivre était plus faible, par détermination électrophotométrique au moyen de la couleur verte donnée par le sel de Spacu, en solution dans le chloroforme [5, 6, 7]. Les courbes d'étalonnage ont été construites à partir d'une solution de sulfate de cuivre dont le métal a été dosé par électrolyse.

PROTOCOLE DES EXPÉRIENCES.

1° DIALYSE VIS-A-VIS D'UNE SOLUTION TRÈS DILUÉE DE CUIVRE. — Le sérum utilisé dans cette expérience contenait 1,2 mg. de cuivre par litre (teneur normale). Nous avons préparé trois dialyseurs aussi semblables que possible et, dans chacun d'eux, nous avons placé 20 c. c. de sérum. Le dialyseur n° 1 (témoin) fut plongé dans de l'eau bidistillée. Le dialyseur n° 2 fut plongé dans un grand volume d'une solution d'un sel de cuivre contenant 2 mg. de cuivre par litre, où il resta pendant cinq jours. Le liquide extérieur était renouvelé deux fois par jour. Le dialyseur n° 3 fut plongé dans une solution identique de cuivre, également renouvelée deux fois par jour, mais le contact fut prolongé pendant dix jours. Les dosages de cuivre ont donné les résultats rassemblés dans le tableau n° 1.

TABLEAU 1.

NUMÉROS des dialyseurs	TENEUR en cuivre du liquide extérieur en milligrammes par litre	DURÉE de la dialyse en jours	TENEUR en cuivre du contenu des dialyseurs en fin d'expérience en milligrammes par litre
I	0	10	3
II	2	5	47
III	2	10	100

Un premier fait se dégage de ces résultats ; le pouvoir de captage du cuivre est très intense. Il conduit en dix jours à une concentration dans le dialyseur, cinquante fois supérieure à la concentration dans le liquide extérieur. D'autre part, la quantité pénétrée dans le dialyseur est proportionnelle à la durée de l'expérience. L'un de nos résultats peut paraître surprenant, c'est celui

qui correspond à notre témoin. En effet, le sérum utilisé dans cette expérience contenait initialement 1,2 mg. de cuivre par litre et le contenu du dialyseur témoin, après dix jours, contenait 3 mg. de cuivre par litre ; or, ce dialyseur n'avait été en contact qu'avec de l'eau bidistillée. Nous avons vérifié ce fait et nous devons conclure que malgré les précautions prises notre eau bidistillée contenait des traces infinitésimales de cuivre, non décelables par une recherche quantitative mais suffisantes pour que le contenu du dialyseur les capte et les accumule au cours des dix journées d'expérience et, comme le volume d'eau bidistillée utilisé ici était très grand, la quantité de cuivre captée finit par être appréciable au dosage. Notons qu'au cours de l'expérience ci-dessus, pendant les dialyses, il est naturellement apparu, dans tous les dialyseurs, un précipité d'euglobulines. Pour effectuer nos prélèvements en vue des dosages, nous avons, chaque fois, homogénéisé soigneusement par agitation.

Conclusions de ce premier essai. — La fixation du cuivre par le sérum peut se faire aussi bien à partir de solutions où sa concentration est chimiquement indécidable qu'à partir de solutions plus concentrées. Le pouvoir de captage est vraiment considérable. Notons, en outre, que l'évolution de la précipitation des euglobulines, au cours de la dialyse, est très fortement influencée par la présence de très petites quantités de cuivre dans le liquide de dialyse. L'époque d'apparition des premières fractions du précipité, puis le volume même du précipité final, ne sont pas semblables, suivant que le liquide extérieur au dialyseur est de l'eau bidistillée ou bien une solution très diluée de cuivre.

2° DIALYSE VIS-A-VIS D'UNE SOLUTION UN PEU PLUS CONCENTRÉE EN CUIVRE. — Dans le deuxième type d'expériences, nous avons étudié le phénomène évoluant lorsqu'un dialyseur, contenant du sérum, est plongé dans une solution de sulfate de cuivre contenant entre 200 et 300 mg. de cuivre par litre. Dans ces conditions, les phénomènes évoluent très rapidement. Le cuivre traverse la paroi du sac de collodion, se fixe sur les protéides dont la teinte vire rapidement du jaune au vert franc, tandis qu'en sens contraire, des sels du sérum diffusent hors du dialyseur à la surface duquel il apparaît bientôt une fine gaine bleue de carbonate cuivrique, formée par interaction des carbonates du sérum et du sulfate de cuivre. Dans l'intérieur du sac on ne voit pas se former de carbonate de cuivre, car les ions Cu semblent être captés trop rapidement par les protéides pour que le carbonate puisse se former. On ne tarde pas à voir apparaître dans le sac, un louche, puis un précipité protéidique et, finalement, tout le contenu du dialyseur se prend en masse pour constituer une pâte d'un beau vert cendré.

Si l'on arrête l'expérience à cet instant, on trouve dans cette pâte une teneur en cuivre de l'ordre de 1.500 mg. par litre. Lorsque le contenu du dialyseur est ainsi devenu une pâte, les phénomènes n'ont pas encore atteint leur terme, car si on laisse le dialyseur dans la solution cuivrique, au cours des heures qui suivent, la masse pâteuse prend un aspect moins compact, puis se redissout partiellement, au fur et à mesure du passage à travers la membrane de nouvelles quantités de cuivre venues de l'extérieur.

Tout semble montrer qu'une certaine quantité de cuivre était capable de précipiter les protéides, mais qu'un excès de cuivre pouvait redissoudre une partie du précipité. Nous avons étudié les conditions et l'évolution du phénomène, en arrêtant la dialyse à divers moments et en soumettant, dans chaque cas, le contenu du dialyseur à l'ultrafiltration vis-à-vis d'une membrane de cellophane. Tant que la quantité de cuivre pénétrée dans le dialyseur est insuffisante pour provoquer la précipitation maxima des protéides, l'ultrafiltrat fut rigoureusement exempt de cuivre, le métal est donc entièrement fixé sur les protéides ; au contraire, lorsque la dialyse a été poursuivie suffisamment longtemps pour qu'une partie du précipité protéidique soit repassée en solution, l'ultrafiltrat contient du cuivre en abondance. Il contient d'ailleurs aussi des ions sulfuriques en quantité correspondante. Voici, par exemple, les résultats obtenus en étudiant le contenu du dialyseur qui fut, pendant quarante-huit heures, immergé dans une solution de sulfate de cuivre, contenant 252 mg. de cuivre par litre : l'ultrafiltrat contenait, par litre, 206 mg. de cuivre et 100 mg. de soufre.

C'est bien la présence d'un excès de sulfate de cuivre, non lié aux protéides, qui provoque la dissolution d'une partie du précipité. En effet, nous avons pris le contenu d'un dialyseur, traité identiquement comme le précédent. Nous avons centrifugé pour éliminer le précipité non redissous par l'excès de cuivre, le liquide surnageant fut décanté et placé dans un autre dialyseur que nous avons immergé dans de l'eau bidistillée. Le sulfate de cuivre libre fut ainsi éliminé et un précipité se forma dans le dialyseur. Lorsque la dialyse fut assez poussée pour que le dialysat ne contienne plus de cuivre, le précipité fut recueilli, séché et analysé. Il contenait 0,9 p. 100 de cuivre.

En somme, lorsque du cuivre pénètre progressivement, par dialyse, dans du sérum, on voit évoluer une série de phénomènes successifs :

1° Lorsque la quantité de cuivre est faible, le sérum reste limpide. Tout le cuivre est alors capté par les protéides, car : a) l'ultrafiltration donne un filtrat qui ne contient pas trace de cuivre ; b) le cuivre est entièrement dissimulé à ses réactifs courants,

même à SH_2 qui ne précipite pas, en milieu neutre, de sulfure de cuivre, mais donne seulement une légère teinte brun rougeâtre.

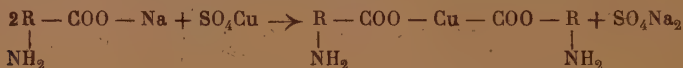
Ces faits nous amènent à conclure que le cuivre se combine aux protéides pour former des complexes typiques et non des sels de cuivre dissociables.

2° Lorsque la quantité de cuivre est plus forte, il se forme des précipités dont l'importance peut être assez grande pour amener la prise en masse lorsque la quantité de cuivre est convenable.

3° Lorsque la quantité de cuivre, entrée dans le dialyseur, est plus élevée encore, une partie des précipités précédemment apparus repasse en solution, mais il y a alors, dans le dialyseur, du cuivre libre en excès par rapport à ce que peuvent fixer les protéides. Si, d'ailleurs, on élimine cet excès de cuivre, on voit se précipiter à nouveau ce qui était dissous, grâce à cet excès. Si on continue alors la dialyse contre de l'eau pure, pendant très longtemps, on ne parvient pas à enlever le cuivre fixé aux protéides.

RECHERCHES SUR LE MODE D'UNION ENTRE CUIVRE ET PROTEIDES.

Nous avons tout d'abord pensé que la combinaison entre cuivre et protéides pouvait se faire suivant le schéma classique :



S'il en était ainsi, la concentration en ions H^+ ou OH^- ne devrait pas changer pendant la réaction ; or, dès l'arrivée des premières traces de sulfate de cuivre, le pH baisse notablement. Pour étudier ce phénomène, nous n'avons plus opéré par dialyse, mais par addition directement au sérum d'une solution de sulfate de cuivre pur. Nous avons, au préalable, constaté que l'addition progressive d'une telle solution donne, comme dans le cas de la dialyse, les trois étapes successives suivantes : 1° Solution limpide lorsqu'il y a peu de cuivre ; 2° précipité abondant, lorsqu'il y a plus de cuivre ; 3° redissolution d'une partie du précipité, lorsqu'il y a un excès de cuivre.

Nous avons étudié l'évolution du pH, au cours de cette addition progressive de sulfate de cuivre et nous avons comparé cette évolution à celle qui correspond à l'addition d'une solution équimoléculaire d'acide sulfurique. Nous avons ainsi constaté que tant que la quantité de cuivre n'est pas très élevée, l'évolution du pH est rigoureusement superposable à celle que l'on obtient par addition d'une quantité équivalente d'acide sulfurique. Le sulfate de cuivre acidifie aussi vite que l'acide sulfurique. Ce fait est fort curieux. Nous l'avons étudié en détail, puis nous avons étendu

notre étude aux cas d'autres sels de cuivre (nitrate, acétate). Voici les résultats de nos mesures (tableaux II, III et IV). Le volume originel du sérum était, dans chaque cas, 5 c. c.

TABLEAU II.

CENTIMÈTRES CUBES ajoutés	OBSERVATIONS	pH	CENTIMÈTRES CUBES ajoutés	OBSERVATIONS	pH
(Acide sulfurique M/10)			(Sulfate de cuivre M/10, pH 4,15)		
0,00.		7,14	0,00.		7,20
0,10.		6,87	0,10.		6,97
0,20.		6,60	0,20.		6,75
0,30.		6,39	0,30.		6,40
0,50.		6,05	0,50.		6,28
0,75.	Aucun précipité.	5,59	0,75.	Précipité net.	6,11
1,00.	Aucun précipité.	5,16	1,00.	Prise en masse.	5,97
1,25.	Aucun précipité.	4,73	1,25.	Redissolution partielle.	5,80
1,50.	Aucun précipité.	4,39	1,50.		5,60
1,75.	Aucun précipité.	4,11	1,75.		5,49
2,00.	Aucun précipité.	3,88	2,00.		5,44

TABLEAU III.

CENTIMÈTRES CUBES ajoutés	OBSERVATIONS	pH	CENTIMÈTRES CUBES ajoutés	OBSERVATIONS	pH
(Acide nitrique M/5)			(Nitrate de cuivre M/10, pH 4,15)		
0,00.		7,20	0,00.		7,23
0,10.		6,99	0,10.		7,03
0,20.		6,71	0,20.		6,79
0,30.		6,50	0,30.		6,62
0,50.		6,27	0,50.	Précipité net.	6,31
0,75.	Aucun précipité.	5,80	0,75.	Prise en masse.	6,08
1,00.	Aucun précipité.	5,26	1,00.	Redissolution partielle.	5,88
1,25.	Aucun précipité.	4,79	1,25.		5,66
1,50.	Aucun précipité.	4,44	1,50.		5,49
1,75.	Aucun précipité.	3,88	1,75.		5,35
2,00.	Aucun précipité.	3,77	2,00.		5,30

Dans la figure 1, nous avons rapporté, à titre d'exemple, les courbes correspondant aux chiffres du tableau II. Nous voyons que lorsqu'on a ajouté à 5 c. c. de sérum 0,4 c. c. soit d'acide sulfurique, soit de sulfate de cuivre N/5, le pH obtenu est le même (6,39 6,40). Si l'on poursuit l'addition d'acide ou de sulfate, les courbes divergent, mais dans leur première partie, elles sont

TABLEAU IV.

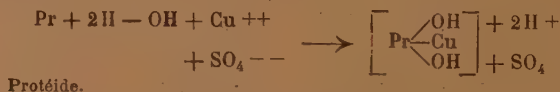
CENTIMÈTRES CUBES ajoutés	OBSERVATIONS	pH	CENTIMÈTRES CUBES ajoutés	OBSERVATIONS	pH
(Acide acétique M/5)			(Acétate de cuivre M/10, pH 4,15)		
0,00.	Aucun précipité.	7,08	0,00.	Précipité net. Prise en masse. Redissolution partielle.	7,12
0,10.		6,89	0,10.		6,84
0,20.		6,62	0,20.		6,70
0,30.		6,44	0,30.		6,49
0,50.		6,10	0,50.		6,26
0,75.		5,69	0,75.		6,15
1,00.		5,40	1,00.		5,97
1,25.		5,21	1,25.		5,86
1,50.		5,02	1,50.		5,78
1,75.		4,86	1,75.		5,68
2,00.		4,80	2,00.		5,62

superposables. Comment interpréter ce fait ? Deux hypothèses pouvaient être envisagées :

1° Les ions cuivre se fixent à la place d'un hydrogène qui, jusqu'alors, n'était pas ionisé. Au cours de cette fixation, le cuivre transmet ses charges positives à cet hydrogène qui forme des ions H^+ , en quantités équivalentes aux ions SO_4 — du sulfate de cuivre était transformé en acide sulfurique.



2° Une deuxième hypothèse est possible : Le protéide fixe non seulement le cuivre mais également des oxhydroyles provenant de l'eau et ceux-ci libèrent une quantité d'ions hydrogène équivalente au cuivre fixé.



Dans ce cas, tout se passe comme si le protéide fixait de l'hydrate cuivrique. Pour choisir entre ces deux hypothèses, nous avons effectué le raisonnement suivant : si c'est l'hydrate cuivrique $Cu(OH)_2$ qui est fixé par les protéides, de l'hydrate cui-

(1) L'hydrogène que déplace le cuivre pourrait appartenir à une fonction acide faible non dissociée, mais il est plus vraisemblable qu'il appartient à une fonction autre, telle que phénol, imine, amine, amide, etc.

rique ajouté dans du sérum doit disparaître, en ne provoquant aucune modification dans la concentration en ions hydrogène du liquide. Nous avons donc préparé de l'hydrate cuivrique, en opérant dans les conditions voulues pour que celui-ci réponde autant que possible à la formule $\text{Cu}(\text{OH})_2$. Nous avons lavé avec soin cet hydrate, puis nous l'avons ajouté par petites quantités à du sérum. Nous avons vu l'hydrate se dissoudre en abondance et, pendant cette dissolution, le pH du sérum est effectivement resté constant. Voici, par exemple, le relevé d'une de nos expériences.

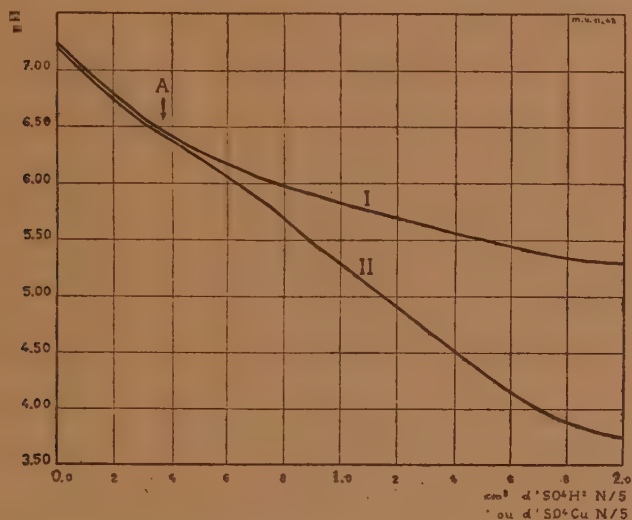


FIG. 1. — La courbe I représente la variation du pH de 5 c.c. de sérum sanguin obtenue par l'adjonction d'une solution de sulfate de cuivre N/5. En A, apparition du premier louche. La courbe II représente la variation obtenue par l'adjonction d'une solution d'acide sulfurique N/5. Il n'apparaît aucun précipité.

L'hydrate cuivrique fut préparé en précipitant une solution à 10 p. 100 de sulfate de cuivre par la quantité strictement nécessaire de soude normale. Le précipité fut recueilli par centrifugation et lavé trois fois par de l'eau pure. Le pH de l'eau du troisième lavage était 8,30.

Nous avons pris un sérum de cheval dont le pH était 7,20. Après addition d'une quantité déjà assez notable d'hydrate cuivrique qui s'était entièrement dissoute, le pH était 7,23. Il ne s'élève pas plus qu'à 7,30 lorsque la quantité d'hydrate cuivrique est suffisante pour qu'il en reste un très léger excès non dissous. Il est évident que si l'on met un gros excès d'hydrate, comme celui-ci est forcément un peu alcalin, on voit le pH s'élever légèrement.

En somme, nous croyons pouvoir conclure de ces essais préliminaires que les protéides forment avec le cuivre des complexes dans lesquels entrent également des ions OH^- . Les complexes qui se forment dans les deux conditions envisagées ci-dessus, c'est-à-dire : 1° par addition de sulfate de cuivre ; 2° par dissolution directe de l'hydrate cuivrique semblent être identiques, car si l'on étudie leur précipitation par acidification, en ajoutant par exemple à leurs solutions, de l'acide sulfurique N/5, on constate que la précipitation évolue, dans les deux cas, d'une façon parfaitement comparable. Le début de la précipitation apparaît à pH 6,05 et le précipité termine sa redissolution à pH 4,0.

Il est important de noter que les complexes que le cuivre et les protéides peuvent former sont cependant très divers, car en opérant dans des conditions différentes, on peut obtenir des résultats différents. Si par exemple, au lieu de préparer un hydrate cuivrique répondant, autant que possible à la formule $\text{Cu}(\text{OH})_2$, on prépare un hydrate ayant été mis en contact avec un fort excès de soude, c'est-à-dire un hydrate dans lequel il y a beaucoup plus de cuivre et moins d'oxhydryle que pour la formule $\text{Cu}(\text{OH})_2$, on constate que ces hydrates partiellement déshydratés se dissolvent également dans le sérum, mais les complexes obtenus ne précipitent pas, par acidification, au même pH que dans les cas précédents. Les précipités sont d'ailleurs beaucoup plus riches en cuivre.

Lorsque l'hydrate cuivrique répond à la formule $\text{Cu}(\text{OH})_2$, si l'on veut parvenir à des complexes précipitables par acidification, il faut laisser le sérum en contact avec un excès d'hydrate pendant une vingtaine d'heures au moins. Au contraire, lorsqu'il s'agit d'hydrate cuivrique partiellement déshydraté par un excès de soude, on obtient, en quelques instants, une teneur en cuivre des complexes, suffisamment élevée pour qu'ils soient précipitables par acidification. En somme, le phénomène n'est pas simple et il semble bien qu'il existe une série de complexes protéides-cuivre.

ACTION DE LA SOUDE SUR LES COMPLEXES PROTÉIDES-CUIVRE.

Si l'on ajoute de la soude à du sérum préalablement additionné de sulfate de cuivre, on voit successivement la teinte varier en fonction de la quantité de soude. Le vert primitif faisant place à du bleu, puis à du rouge vineux pour aboutir enfin à du rouge violacé, d'autant plus violet qu'il y a plus de cuivre dans le mélange. Ce fait bien connu correspond à la réaction du Biuret. La capacité de combinaison des protéides avec le cuivre s'élève notablement au cours de cette alcalinisation, car si l'on ajoute de l'hydrate cuivrique au mélange alcalin, il s'en dissout beaucoup plus que dans le sérum non alcalinisé. Si l'on élimine ensuite l'alcali d'un mélange ainsi surchargé de cuivre en milieu alcalin,

on ne voit pas se séparer à nouveau l'hydrate cuivrique dont l'alcali avait permis la dissolution.

L'alcalinisation modifie en somme profondément l'affinité des protéides pour le cuivre, elle ne semble cependant pas modifier fortement les complexes protéides-cuivre formés préalablement sans alcalinisation. En effet, si l'on dissout de l'hydrate cuivrique dans du sérum sans alcaliniser, puis si l'on alcalinise ensuite sans ajouter à nouveau de l'hydrate cuivrique, on obtient un mélange qui, par élimination ultérieure de l'alcali par dialyse, retrouve l'aspect et les propriétés principales qu'il présentait avant alcalinisation. L'étude des complexes très riches en cuivre que l'on peut former en milieu alcalin mériterait une étude spéciale, mais nous n'envisageons pas plus avant ce problème dans le présent mémoire.

ETUDES SUR LA DIALYSE DES COMPLEXES CUIVRE-PROTÉIDES.

Au cours des essais rapportés ci-dessus, nous avons souvent eu l'occasion de soumettre à la dialyse des sérums additionnés d'hydrate de cuivre. Un fait nous est apparu au cours de ces essais : l'équilibre de pression osmotique vers lequel on tend est très différent de celui qui correspondrait à du sérum sans cuivre. Ce point a attiré notre attention et nous avons construit un osmomètre nous permettant de l'étudier. Nous nous sommes inspirés de l'osmomètre de Sørensen [8]. Un sac de collodion est fixé sur un ajutage surmonté par un tube semi-capillaire dans lequel on peut, au moyen d'un cathétomètre, étudier les déplacements du ménisque supérieur du liquide contenu dans le sac. Le tube semi-capillaire est en relation avec un très grand tube en U gradué, garni d'eau, qui sert de manomètre. On établit dans l'appareil la pression nécessaire pour que le ménisque reste immobile et cette pression est mesurée sur le manomètre à eau. Nous avons fait plonger le sac de collodion dans de l'eau bidistillée, constamment renouvelée par un écoulement continu assez lent. Les substances dialysables diffusent ainsi hors du sac et sont progressivement entraînées par le lent courant d'eau ; on ne parvient à un équilibre osmotique vrai que lorsque toutes les substances diffusibles sont éliminées. La pression limite est nulle si le sac de collodion ne retient aucun protéide soluble. Si, au contraire, il reste dans le sac des protéides solubles (ou des substances macromoléculaires ou des colloïdes quelconques non floculés), la pression limite n'est pas nulle. Pour éviter toute dilution des protéides par endosmose, avant atteinte de l'équilibre, nous devons maintenir constamment une pression maintenant immobile le ménisque dans le tube semi-capillaire. Cette contre-pression varie en fonction du temps écoulé depuis le début de la dialyse. En effet, au début, il existe dans le sac de collodion, des ions et des molécules diffusibles non encore

éliminés par dialyse, auxquels correspond une « pression osmotique » élevée (l'interaction des protéides et de certains de ces ions influe d'ailleurs grandement sur la pression mesurée) et cette pression va se modifier progressivement au cours de l'élimination des substances dialysables. En suivant l'évolution de la contre-pression, au cours de la dialyse, on obtient des renseignements intéressants sur le passage des substances diffusibles à travers la membrane de collodion. Si l'on opère avec une solution pure d'une substance diffusible, telle que du glucose, la contre-pression baisse très rapidement et elle devient nulle en moins d'une heure (courbe I). Les sacs de collodion que nous utilisons sont donc très perméables pour des molécules telles que le glucose et les sels en l'absence de protéides. Si l'on place du sérum dans le dialyseur, la contre-

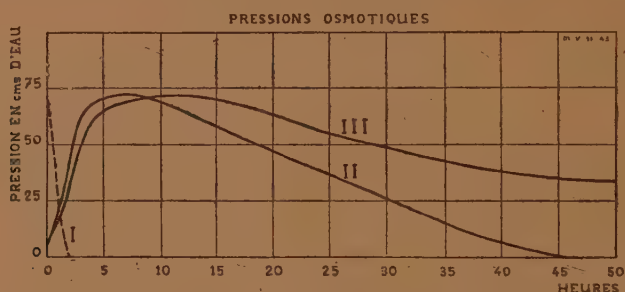


FIG. 2. — La courbe I représente la variation de la pression osmotique d'une solution de glucose à 1 p. 100; la courbe II, celle du sérum sanguin complexifié au maximum; la courbe III, celle d'un sol colloïdal de ferrocyanure ferrique à 2,5 p. 100 fraîchement préparé.

pression évolue en fonction du temps d'une façon entièrement différente et il faut plusieurs jours pour que la pression limite soit atteinte (courbe V).

Tout se passe comme si la présence des protéides freinait considérablement la dialyse des sels et des substances diffusibles du sérum. Ceci n'est pas caractéristique des seuls protéides, puisqu'on constate aussi des faits semblables dans le cas d'une solution colloïdale de ferrocyanure ferrique (courbe III). Ce phénomène mériterait à lui seul une longue étude sur laquelle nous espérons revenir dans un mémoire ultérieur, nous n'envisageons ici que les modifications apportées par la présence de quantités variables de cuivre dans le sérum.

Dès que l'on combine un peu de cuivre aux protéides du sérum, on voit la courbe représentative des variations de la contre-pression se modifier profondément (courbes II et IV) : 1° la contre-pression ne s'élève jamais aussi haut; 2° elle baisse ensuite beaucoup plus

rapidement ; 3° lorsque la quantité de cuivre présente n'est pas trop faible, la pression limite est nulle, ce qui prouve qu'il ne reste alors plus de protéides solubles dans l'eau, lorsque les sels sont éliminés, ni de colloïde non flocculé ; 4° même lorsque la pression est tombée à zéro il reste du cuivre en abondance dans le dialyseur, ce cuivre est combiné aux protéides et la dialyse ne l'élimine pas. En somme, le cuivre en se combinant aux protéides modifie considérablement leurs propriétés physico-chimiques et ce fait montre, en particulier, combien il faut tenir compte de certaines impuretés non protéidiques présentes dans le liquide, lorsque l'on veut déterminer la pression osmotique des protéides. Le cuivre n'a pas le monopole de s'unir aux protéides qui ont des réactivités mul-

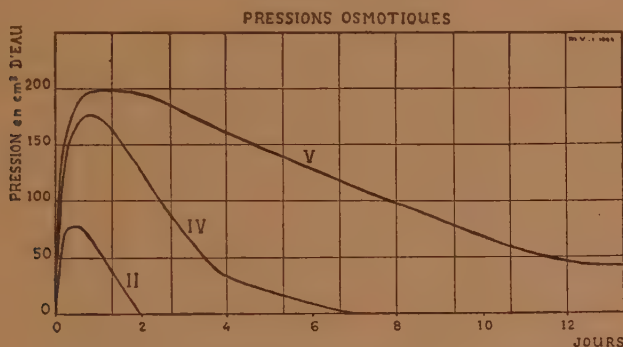


FIG. 3. — La courbe V représente la variation de la pression osmotique du sérum sanguin pur ; la courbe IV, celle du même sérum légèrement complexifié ; la courbe II, celle du même sérum complexifié au maximum.

tiples et l'intérêt que nous trouvons à l'étude du cas particulièrement commode du cuivre est accru de ce fait.

Notons, pour terminer, que les essais rapportés dans ce mémoire introductif n'ont porté que sur du sérum total, or ce liquide ne contient pas seulement des protéides ; certaines des substances non protéidiques qu'il contient interviennent probablement dans certains des phénomènes étudiés. Nous poursuivons naturellement l'étude sur des protéides séparés.

RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS.

Les protéides du sérum ont une affinité considérable pour le cuivre avec lequel ils forment des complexes typiques. Cette affinité est tellement élevée que les protéides placés dans un dialyseur peuvent capter des traces de cuivre présentes dans le liquide qui baigne le dialyseur.

Lorsque l'on ajoute à du sérum une petite quantité de sulfate de

cuivre, le mélange est aussi acide que si l'on avait ajouté, directement au sérum, une quantité équimoléculaire d'acide sulfurique. Les protéides, en effet, captent non seulement les ions Cu^{++} , mais aussi des ions OH^- en quantité telle que tout se passe comme si les protéides fixaient $\text{Cu}(\text{OH})_2$.

D'ailleurs le sérum est capable de dissoudre directement de l'hydrate cuivrique qu'on lui ajoute et, dans ce cas, il ne se produit ni acidification, ni alcalinisation notable.

Si l'on opère en milieu nettement alcalin (soude), la quantité de cuivre que peuvent fixer les protéides est plus élevée qu'en milieu proche de la neutralité.

Lorsque l'on soumet à la dialyse un sérum additionné de cuivre, on constate que les substances dialysables diffusent beaucoup plus vite qu'en l'absence de cuivre et que la pression osmotique limite vers laquelle on tend par élimination des substances diffusibles est plus faible ; cette pression limite est nulle lorsqu'il y a assez de cuivre, car les complexes protéides-cuivre, ainsi formés, sont insolubles dans l'eau, lorsque les sels sont éliminés. La dialyse n'élimine pas le cuivre fixé aux protéides qui est d'ailleurs masqué à certains de ses réactifs. Il s'agit de complexes typiques.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] DEVAUX. *Mémoire de la Soc. des Sc. phys. et natur. de Bordeaux*, 1886, **1**, 1 ; *C. R. Acad. Sc.*, 1091, **132**, 717.
- [2] COUPIN. *C. R. Acad. Sc.*, 1901, **132**, 645.
- [3] DEHERAIN et DEMOUSSY. *C. R. Acad. Sc.*, 1901, **132**, 523.
- [4] BATTUT. *Thèse Bordeaux*, 1939.
- [5] SPACU. *Zeitsch. für anal. Chem.*, 1927, **71**, 97, 185, 442 ; 1927, **72**, 289 ; 1928, **73**, 279, 356.
- [6] PAULAI. *Thèse Sciences*, Paris, 1939.
- [7] BERTRAND (D.). *Bull. Soc. Chim. et Biol.*, 1943, **25**, 43.
- [8] SOERENSEN. *C. R. Lab. Calsberg*, 1917, **12**, 262.

RECHERCHES SUR LES NUCLÉOPROTEIDES DES MICRO-ORGANISMES

II. — SUR LA NATURE DES PROTÉIDES PHOSPHORÉS DES LEVURES (*)

par RENÉ SARCIRON.

(Institut Pasteur, annexe de Garches.)

Pendant longtemps on a rapproché sous la dénomination de nucléines deux séries de composés protéidiques phosphorés de natures différentes. C'est à Kossel (1) que l'on doit d'avoir le premier établi une distinction entre les « nucléoprotéides » vrais, que l'on trouve dans toutes les cellules vivantes, et les « paranucléoprotéides », assez peu nombreux et qui, à notre connaissance, n'existent que dans des produits destinés à l'alimentation du jeune animal (caséine du lait), voire même de l'embryon (vitelline de l'œuf). Tandis que les nucléoprotéides contiennent de l'acide nucléique, de nature non protéidique, que l'on peut isoler et caractériser par le fait que dans ce dernier l'acide phosphorique est, par l'intermédiaire d'un pentose, combiné à des quantités définies de bases puriques et pyrimidiques, ces bases sont absentes dans ce que l'on appelle maintenant les phosphoprotéides, chez lesquels l'acide phosphorique est directement lié à un acide oxy-aminé, la sérine par exemple.

Ces faits étant connus, par un traitement légèrement alcalin P. Thomas (2) a pu, à partir de levures préalablement desséchées, extraire deux fractions de nature protéidique et séparer ainsi une substance qu'il considéra comme un phosphoprotéide et qu'il appela la « zymocaséine ». La présence d'acide nucléique dans la levure n'étant pas contestable puisque c'est la matière première utilisée industriellement pour préparer l'acide zymonucléique, il nous a paru intéressant de vérifier l'existence, dans la levure, de phosphoprotéides conjointement avec les dérivés nucléiques et même de voir si l'on ne se trouvait pas en présence d'un composé

(*) Note présentée à la séance du 3 février 1944 de l'Association des Microbiologistes de langue française.

(1) KOSSEL, Z. *Physiol. Chem.*, 1886, **10**, 248.

(2) P. THOMAS, ces *Annales*, 1921, **35**, 43.

d'un type nouveau où l'acide nucléique serait conjugué à un phosphoprotéide par exemple.

Pour obtenir la zymocaséine, Thomas laisse sécher, à une température ne dépassant pas 37°, des levures qui ont été préalablement pressées, puis il les laisse macérer pendant huit heures à 35° dans 10 fois leur poids d'une solution de carbonate de soude à 0,5 p. 100. La suspension est ensuite filtrée à la glacière et le liquide clair traité par l'acide acétique, le précipité est essoré, redissous dans du carbonate de soude, reprécipité par l'acide acétique et ainsi de suite plusieurs fois. Il obtient ainsi un produit de nature protéidique contenant 1,75 p. 100 de phosphore : la zymocaséine.

Pour justifier cette dénomination, P. Thomas, en la comparant à d'autres phosphoprotéides connus : la caséine du lait, l'ovovittelline, a trouvé un certain nombre de propriétés voisines (stabilité relative à la chaleur, solubilité dans les alcalis, minéralisation, par la soude, du phosphore organique, action de la présure), mais ceci n'est pas spécifique des phosphoprotéides, les nucléoprotéides étant également stables à la chaleur, solubles dans les alcalis, ces derniers transformant également le phosphore nucléique en phosphore minéral. De plus, si dans les conditions de préparation, l'acide zymonucléique est soluble et se trouve donc éliminé du précipité, il n'en est pas de même des nucléoprotéides que l'on devrait retrouver au moins comme surcharge, à moins qu'ils ne fussent déjà décomposés par le traitement. Il manquait donc à Thomas d'avoir prouvé l'absence de bases puriques dans sa préparation pour que la qualification soit certaine.

Nous avons donc refait la préparation dans les mêmes conditions en dosant après chaque précipitation l'azote total, l'azote purique et le phosphore (3), de façon à suivre la purification, et nous avons noté que dès la quatrième purification le rapport du phosphore à l'azote total devenait constant.

Ayant répété notre extraction sur différents lots de levure, nous avons ainsi obtenu des produits dont les teneurs en azote purique et phosphore sont très variables. On peut supposer que ces variations sont dues pour une grande part à la durée plus ou moins longue de la dessiccation de la levure, opération pendant laquelle des actions diastasiques ont dû avoir lieu, libérant de l'acide nucléique soluble en milieu faiblement acétique, donc échappant à la précipitation.

Les principaux résultats sont consignés dans le tableau suivant :

(3) Le phosphore a été dosé à l'aide de la méthode décrite par BRIGGS (*J. biol. Chem.*, 1922, **53**, 13), le dosage de l'azote purique ayant déjà fait l'objet d'une note précédente (R. SARCIRON, R. VENDRELY et O. BRIAND, *Ass. Microb. L. Franç.*, ces *Annales*.)

	N TOTAL p. 100	P TOTAL p. 100	N PURIQUE p. 100	N TOTAL P	N PURIQUE P
Préparation de Thomas. Moyenne . .	16,15	1,79		9,0	
Préparation n° 10	15,1	1,70	1,85	8,9	1,09
Préparation n° 5	13,35	1,30	1,22	10,2	0,945
Préparation n° 7	12,7	1,84	1,74	6,9	0,94
Préparation n° 13	13,48	0,77	0,83	17,5	1,08

On peut noter que toutes nos préparations contiennent des purines en quantités non négligeables et que, quelles que soient les teneurs absolues en purines et en phosphore, le rapport des richesses de ces deux constituants est toujours du même ordre de grandeur et très voisin de ce qu'il serait pour un acide nucléique théorique (1,13). Il y a donc lieu de penser que nos préparations sont, non pas des phosphoprotéides, mais des nucléoprotéides. Nous pouvons confirmer cette hypothèse en isolant d'une part le groupement prosthétique et de l'autre la partie protéique.

Une première indication nous est donnée par l'action d'un ferment comme la trypsine qui digérera le substrat et nous permettra d'isoler sans trop le dégrader la fraction nucléique. Pour cela, le produit à étudier est traité en solution légèrement alcaline par 10 p. 100 de son poids de trypsine, le pH du milieu étant maintenu aux environs de 8,5. Après un séjour de vingt-quatre heures à l'étuve à 37°, la solution ne reprécipite plus par addition d'acide acétique. On acidule alors avec de l'acide chlorhydrique jusqu'à coloration bleue d'un papier au rouge Congo, ajoute un volume d'alcool et laisse reposer vingt-quatre heures à la glacière. Le précipité formé est recueilli et séché. On obtient ainsi un produit ayant la composition d'un acide nucléique impur.

	N TOTAL p. 100	P p. 100	N PURIQUE p. 100	N TOTAL P	N PURIQUE P
Préparation n° 13	13,48	0,77	0,83	17,5	1,08
Préparation après digestion par la trypsine	11,5	1,85	5,88	2,3	1,21
Acide nucléique (théorie)				1,9	1,13

A la température ordinaire, la soude en solution normale détruit la liaison nucléoprotéique et même, si l'action est suffisamment prolongée, clive l'acide en ses divers éléments. Il est ensuite pos-

sible de reprécipiter la protéine par l'acide acétique, les bases puriques et le phosphore restant en solution dans les eaux-mères.

Si on traite le nucléoprotéide par 200 fois son poids d'une solution normale de soude, il s'y dissout rapidement et on l'abandonne plusieurs jours, soit à la glacière, soit à la température ordinaire. On ajoute ensuite de l'acide acétique tant qu'il y a précipitation, centrifuge, lave et sèche le précipité.

Nous avons obtenu les résultats suivants :

	N TOTAL p. 100	P p. 100	N PURIQUE p. 100	N TOTAL p	N PURIQUE p
Préparation n° 10 :					
Avant traitement	15,1	1,7	1,85	8,9	1,09
Traitée à la soude	12,5	0,1	0,08	125	0,8
Préparation n° 13 :					
Avant traitement	13,48	0,77	0,83	17,5	1,08
Traitée à la soude	11,9	0,1	0,09	119	0,9

Par action prolongée de la soude, il a donc été possible d'éliminer plus des 9/10 du phosphore et de l'azote purique.

Si par la digestion trypsique on démontre la présence d'acide nucléique, en aucun cas on ne peut par cette méthode affirmer la présence ou l'absence d'un phosphoprotéide, l'acide phosphorique résiduel n'étant pas attribuable spécifiquement à l'un ou à l'autre composé. Quant au traitement par la soude, s'il décompose la copule nucléique, il attaque également les phosphoprotéides dont il minéralise le phosphore (4), mais le fait que les taux de bases puriques par rapport au phosphore sont sensiblement les mêmes que pour un acide nucléique, ceci avant ou après traitement alcalin, que ce traitement élimine pratiquement la totalité de ces constituants, prouve que l'on ne peut envisager sérieusement la présence d'un phosphoprotéide et que nos préparations doivent être considérées comme des combinaisons d'acide nucléique et d'une matière protéique non phosphorée.

Et, comme il y a tout lieu de penser que les préparations de Thomas et les nôtres sont comparables (tout au moins notre préparation n° 10), il nous semble justifié d'admettre que la « soi-disant zymocaséine » de cet auteur contenait des bases puriques et par conséquent était un nucléoprotéide. De plus, les variations de richesse en acide nucléique du produit obtenu, variations liées,

(4) R. H. A. PLIMMER et W. M. BAYLISS, *J. Physiol.*, 1905-1906, **23**, 439.

semble-t-il, à une action enzymatique plus ou moins prolongée avant le traitement alcalin, pourraient expliquer pourquoi Luers et Nowak (5) ont pu isoler un produit à faible teneur en azote purique, mais pour lequel l'absence de dosage de phosphore ne permet pas de conclure à une zymocaséine comme l'ont fait ces auteurs.

En résumé, nous ne pensons pas qu'il existe un phosphoprotéide susceptible d'être extrait par un traitement au carbonate de soude à partir de levures desséchées, les phosphoprotéides restant jusqu'ici l'apanage du règne animal. Bien au contraire nous avons tout lieu de croire que la zymocaséine extraite par Thomas est un nucléoprotéide analogue aux préparations que nous avons obtenues et dont nous avons démontré la constitution : matière protéidique non phosphorée combinée à un acide nucléique, la composition et le rendement étant variables avec les conditions d'extraction.

(5) H. LUERS et G. NOWAK, *Bioch. Zeitschr.*, 1924, **154**, 310.

**UN NOUVEAU RÉACTIF BIOLOGIQUE
DE L'ACIDE *p*-AMINOBENZOÏQUE
LE TRYPANOSOMIDE *STRIGOMONAS ONCOPELTI* (*)**

par MARGUERITE et ANDRÉ LWOFF.

(Service de Physiologie Microbienne de l'Institut Pasteur.)

Le Trypanosomide *Strigomonas oncopelti* se multiplie abondamment en eau peptonée : peptone de viande 15, NaCl 6, eau distillée 1.000, NaOH q. s. pour pH 7 [1]. Par contre, dans ce même milieu additionné de *p*-aminophénylsulfamide à une concentration M/72 à M/144, le développement est inhibé. Alors que, à 28°, dans les conditions de nos expériences, on observe dans les tubes témoins un voile abondant et un trouble important du milieu au troisième jour, il n'y a, dans le milieu sulfamidé, aucun développement visible à l'œil nu après trois semaines. Pour une concentration de M/288 l'inhibition est passagère : retard du développement de trois à quatre jours. Si l'ensemencement a été abondant dans un milieu renfermant du sulfamide M/72, il se constitue à la partie supérieure de la colonne liquide un « anneau » de flagellés, mais le développement ne se poursuit pas. Quoique nous n'ayons pas effectué de numérations, il semble très vraisemblable que, dans les milieux sulfamidés, les *Strigomonas*, comme les bactéries et comme le flagellé *Polytomella caeca* [2], subissent deux ou trois divisions avant que la multiplication ne s'arrête. Les flagellés restent cependant vivants car l'addition d'acide *p*-aminobenzoïque à des cultures bloquées provoque le départ de la multiplication même après cinquante-trois jours de contact avec le sulfamide.

Si, avant l'ensemencement, on ajoute de l'acide *p*-aminobenzoïque au milieu peptoné sulfamidé, le développement a lieu normalement. L'action inhibitrice du sulfamide M/72 est complètement supprimée par l'acide *p*-aminobenzoïque M/1,9 $\times 10^7$. Pour la même concentration de sulfamide et en présence d'acide *p*-aminobenzoïque M/3,8 $\times 10^7$, le départ de la culture est simplement retardé de deux à trois jours par rapport au témoin. Les

(*) Note présentée à la séance du 3 février 1944 de l'Association des Microbiologistes de langue française.

acides *o*- et *m*-aminobenzoïques à concentration $M/1,9 \times 10^3$, c'est-à-dire 10.000 fois supérieure à celle de l'acide *p*-aminobenzoïque, n'exercent aucune action neutralisante. Ils n'exercent pas non plus, à cette concentration, d'action inhibitrice. Il en est de même de la *p*-aminophénylalanine. La *p*-aminostovaine, la novocaïne (chlorhydrate du β -diéthyl-aminoéthyl *p*-aminobenzoate) et la benzocaïne (éthyl-*p*-aminobenzoate) neutralisent l'action du *p*-aminophényl sulfamide.

C'est à notre connaissance la première fois que l'on signale la sensibilité d'un Trypanosomide aux composés sulfamidés. Le fait que l'action inhibitrice se manifeste en eau peptonée lui est commun avec de nombreuses bactéries (v. tableau). La solution de peptone de muscle utilisée renferme moins de 1 pour 280 millions d'acide *p*-aminobenzoïque. Celui-ci ne peut donc être tenu pour responsable de l'action antisulfamide des peptones de muscle vis-à-vis des bactéries comme *Proteus vulgaris* ou *Escherichia coli* [3]. Ceci est en parfait accord avec les conclusions de Tabone et Nitti [4] relatives à la présence de substances antisulfamides non spécifiques dans les hydrolysats de muscle. *Strigomonas*

Sensibilité comparée de quelques microorganismes au *p*-aminophényl sulfamide et activité neutralisante de l'acide *p*-aminobenzoïque et de la « peptone ».

	SENSIBILITÉ au sulfamide (4)	ACTIVITÉ NEUTRALISANTE	
		de l'acide <i>p</i> -amino- benzoïque (5)	de la « peptone »
<i>Coli</i> (1), <i>Proteus</i> , Friedländer (1a) . . .	+	500 à 2 000	+++
<i>Polytomella cæca</i> (2)	++	1 à 1.200 (6)	+++
<i>Strigomonas oncopelti</i> (3)	+	264.000	0
Streptocoque, Pneumocoque (1a) . . .	+	2.000	0
Méningocoque (1a)	++	5	0
Gonocoque (1, 1a)	++	5 à 20 (7)	0
<i>Glaucoma piriiformis</i> (3)	+	0 (8)	0

(1) D. D. WOODS. — (1a) F. NITTI et J. TABONE. — (1b) J. KIMMIG.

(2) A. LWOFF, F. NITTI, M^{me} TRÉFOUEL et V. HAMON.

(3) Résultats originaux.

(4) +, Inhibition pour des concentrations supérieures à 1 p. 2.000 seulement; ++, inhibition pour des concentrations égales ou inférieures à 1 p. 2.000.

(5) Les chiffres représentent la valeur maximum du rapport : concentration moléculaire en sulfamide/concentration moléculaire en acide *p*-aminobenzoïque, pour lequel le développement est normal.

(6) Une molécule d'acide *p*-aminobenzoïque neutralise une molécule de sulfamide à pH 7,5 et 1.900 à pH 3,7 (point isoélectrique de l'acide *p*-aminobenzoïque).

(7) L'acide *p*-aminobenzoïque n'exerce une action neutralisante que si la concentration en sulfamide est inférieure à 1 p. 2.000.

(8) L'acide *p*-aminobenzoïque exerce lui-même une action inhibitrice sur le cilié et le tue dans les milieux acides

oncopelti est, en tout cas, insensible aux antisulfamides non spécifiques.

La particularité de ce flagellé réside dans sa très grande sensibilité à l'acide *p*-aminobenzoïque. Alors que le développement des microorganismes étudiés jusqu'ici ne se produit normalement que si l'acide *p*-aminobenzoïque est utilisé à une concentration égale ou au plus 2.000 fois inférieure à celle des sulfamides, les flagellés se contentent d'une concentration 264.000 fois inférieure.

D'après la conception de Fildes et Woods [5], les sulfamides entrent en compétition pour un enzyme dont le substrat normal est l'acide *p*-aminobenzoïque. L'enzyme de *Strigomonas* ne présente pas d'affinité particulière pour le sulfamide : les concentrations nécessaires pour inhiber la multiplication des flagellés sont du même ordre de grandeur que celles nécessaires pour inhiber le développement des autres microorganismes. Par contre, il présente une affinité beaucoup plus élevée pour l'acide *p*-aminobenzoïque. Il est possible que cette affinité plus grande tienne aux propriétés particulières des groupements réactionnels fixant les radicaux $-\text{NH}_2$ et $-\text{COOH}$. A l'appui de cette hypothèse nous voyons le fait que le développement de *Strigomonas oncopelti* est inhibé (retard de deux à trois jours) par l'acide *o*-aminobenzoïque à une concentration de M/50. Cette action inhibitrice est supprimée par l'acide *p*-aminobenzoïque M/1,9 $\times 10^7$. L'acide *m*-aminobenzoïque M/50 n'exerce aucune action inhibitrice.

On sait que l'acide *p*-aminobenzoïque est un facteur de croissance pour les bactéries *Clostridium acetobutylicum* [6] et *Streptobacterium plantarum* [7]. Ces deux bactéries ont été utilisées comme test biologique ; mais ce test nécessite l'emploi d'un milieu synthétique dont certains constituants, en raison des circonstances, ne peuvent être obtenus. *Strigomonas oncopelti* en milieu peptoné sulfamidé constitue un test moins sensible mais cependant très pratique. Ce test est mis en œuvre de la façon suivante :

A 5 c. c. d'eau peptonée à 1,5 p. 100 on ajoute 2 c. c. de sulfamide à 1 p. 100 et 1 c. c. de dilutions variables de la liqueur à titrer. On ensemence avec 1 goutte d'une culture jeune. 1 c. c. de la dilution minimum permettant une culture identique à celle du témoin (sulfamide + peptone + acide *p*-aminobenzoïque) contient $5,76 \times 10^{-8}$ g. d'acide *p*-aminobenzoïque. 1 c. c. de la dilution qui entraîne le déblocage après un retard de deux jours environ en contient une quantité deux fois moindre.

Nous avons ainsi déterminé la teneur en acide *p*-aminobenzoïque de la levure de boulangerie (levure Springer) hydrolysée par l'acide chlorhydrique à 100° et trouvé 2 mg. par kilogramme de poids sec, chiffre très voisin de celui déterminé par Kuhn et Schwarz pour la levure de brasserie (1 à 2 mg.).

L'hydrolysate de levure est donc très pauvre en acide *p*-aminobenzoïque ; celui-ci ne peut être tenu pour responsable que d'une très faible partie de son action antisulfamide. Cette conclusion est en accord avec celle de Loomis, Hubbard et Neter [8] et de Tabone, Nitti et Mousset [9].

Tous les *Strigomonas* ne réagissent pas de la même façon au sulfamide. *Strigomonas culicidarum*, en eau peptonée additionnée d'hémine s'est montré insensible à l'action du *p*-aminophényl sulfamide M/72. Ceci peut tenir ou bien à une moins grande sensibilité au sulfamide ou bien à une plus grande sensibilité à l'égard des antisulfamides de la peptone, qu'il s'agisse soit des antisulfamides non spécifiques, soit de l'acide *p*-aminobenzoïque qui pourrait exister dans l'eau peptonée à des dilutions telles que *Strigomonas oncopelti* ne le mettrait pas en évidence.

CONCLUSIONS. — Le développement du flagellé Trypanosomide *Strigomonas oncopelti* est inhibé par le *p*-aminophényl sulfamide. Cette action est neutralisée par l'acide *p*-aminobenzoïque à une concentration 264.000 fois inférieure à celle du *p*-aminophényl sulfamide.

L'acide *o*-aminobenzoïque M/50 est également inhibiteur. Son action est neutralisée par l'acide *p*-aminobenzoïque M/1,9 × 10⁷.

Le flagellé peut être utilisé pour la détection et le dosage de très petites quantités d'acide *p*-aminobenzoïque. La limite de sensibilité dans les conditions que nous avons déterminées est comprise entre M/1,9 × 10⁷ et M/3,8 × 10⁷.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] LWOFF (M.). *C. R. Soc. Biol.*, 1930, **105**, 835.
- [2] LWOFF (A.), NITTI (F.), TRÉFOUEL (M^{me} J.) et HAMON (M^{le} V.). *Ces Annales*, 1941, **67**, 9.
- [3] LWOFF (A.), NITTI (F.) et TRÉFOUEL (M^{me} J.). *Ces Annales*, 1941, **67**, 173.
- [4] NITTI (F.) et TABONE (J.). *Ces Annales*, 1942, **68**, 360 ; 1942, **68**, 416.
— TABONE (J.), NITTI (F.) et MOUSSET (H.). *Ces Annales*, 1942, **68**, 470.
- [5] WOODS (D. D.) et FILDES (P.). *Chemistry and Industry*, février 1940, 133. — WOODS (D. D.). *Brit. Jl exp. Path.*, 1940, **21**, 84.
- [6] RUBBO (S. D.) et GILLESPIE (J. M.). *Lancet*, 1942, **242**, 36.
- [7] KUHN (R.) et SCHWARZ (K.). *Ber. deut. chem. Ges.*, 1941, **74**, 1617.
- [8] LOOMIS (T. A.), HUBBARD (R. S.) et NETER (E.). *Proc. Soc. exp. Biol.*, 1941, **47**, 159.
- [9] TABONE (J.), NITTI (F.) et MOUSSET (H.). *Ces Annales*, 1942, **68**, 496.

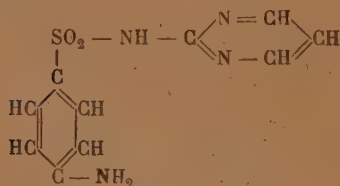
ACTION SUR L'ORGANISME DE LA *p*-AMINOPHÉNYLSULFAMIDO-2-PYRIMIDINE ET DE LA MÉTHYLDIAZINE (*)

par RENÉ MARTIN, BERNARD SUREAU et YVONNE JOYEUX.

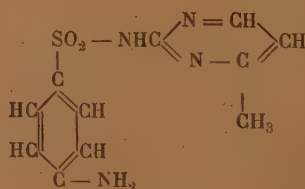
Depuis plus de six mois nous utilisons, en liaison étroite avec le D^r Nitti que nous tenons à remercier pour tous les précieux renseignements qu'il a bien voulu nous donner, la *p*-aminophénylsulfamido-2-pyrimidine ou sulfapyrimidine-2616 RP (adiazine, sulfadiazine dans les pays de langue anglaise ; pyrimal, débénal, dans les pays de langue allemande) et son dérivé monométhylé 2632 RP (méthyldiazine, percoccide) dans le traitement de diverses affections microbiennes. Nous avons indiqué, par ailleurs, les résultats remarquables que la thérapeutique est en droit d'attendre de ces nouveaux dérivés sulfamidés ; nous voudrions, après un bref rappel de leurs caractéristiques chimiques, exposer quelques faits concernant les réactions de l'organisme à ces produits : toxicité, tolérance, modes d'absorption, de répartition et d'excrétion.

*
* *

La *p*-aminophénylsulfamido-2-pyrimidine, synthétisée en 1940 par Roblin, puis étudiée par Long en Amérique et Schering en Allemagne, est une sulfamide comportant un noyau pyrimidine : cette particularité rend sa fabrication très délicate. Elle a pour formule



Sulfadiazine.



Méthyldiazine.

La méthyldiazine diffère de la sulfadiazine par l'adjonction d'un radical méthyle en méta sur le noyau pyrimidine. On connaît éga-

(*) Note présentée à la séance du 3 février 1944 de l'Association des Microbiologistes de langue française.

lement le dérivé diméthylé (2633 RP), très actif, mais trop toxique pour être utilisé en thérapeutique.

*
* *

La pharmacologie de la sulfadiazine est liée à l'expérimentation sur l'animal, particulièrement sur la souris. Feinstone, Williams, Wolff, Huntington et Crossley ont établi que la dose toxique aiguë du produit *per os* est supérieure à 10 g. par kilogramme de poids. Pour le sel de soude injecté par voie parentérale cette dose toxique varie entre 1,50 et 1,75 g. par kilogramme de poids, dose correspondant à une concentration de 175 à 200 mg. de sulfamide pour 100 dans le sang. Le sulfathiazol est toxique à 80 mg. pour 100, la sulfapyridine à 65 mg. pour 100.

La toxicité chronique de la sulfadiazine nécessite chez le singe une dose plus élevée que pour le sulfathiazol ou la sulfapyridine. Car l'acétylsulfadiazine est plus soluble dans les urines que les dérivés acétylés de la sulfapyridine et du sulfathiazol ; en outre, les formes conjuguées de l'adiazine se trouveraient dans l'organisme dans des proportions plus faibles que celles de la sulfapyridine.

L'étude de la concentration sanguine obtenue en fonction du sulfamide administré n'a donné que des résultats peu précis, variant d'une espèce à l'autre et même d'un sujet à l'autre.

La sulfadiazine est donc très peu toxique : Bruno Schmidt, qui l'utilise pour le traitement des méningites otogènes, écrit qu'il n'a pas observé d'incidents et qu'elle est très bien supportée, même chez l'enfant et à très hautes doses. Schreus et Schölzke font les mêmes constatations au cours du traitement des gonococcies.

Jusqu'ici les auteurs n'ont utilisé la sulfadiazine qu'à des doses orales n'excédant pas 10 g. par jour pour un adulte de 60 kg. environ, soit au maximum 20 cg. par kilogramme de poids. Nous avons été amenés à dépasser de beaucoup ces doses sans avoir à noter d'incidents sérieux : chez tous nos malades nous avons pratiqué des numérations sanguines avec formule ; ces examens répétés n'ont montré que des altérations négligeables. Monique Th..., fillette de cinq ans, pesant 15 kg., a reçu 18 g. de sulfamide dont 12 g. de sulfadiazine *per os* et 6 g. de 1162 F par voie sous-cutanée par vingt-quatre heures, soit 1,20 g. par kilogramme de poids ; cette fillette avait présenté une intolérance absolue à l'administration de 12 g. de 1162 F, quelle que soit la voie d'introduction ; aucun incident ne s'est produit. Un autre malade, âgé de dix-sept ans, pesant 50 kg., a pu absorber jusqu'à 40 g. par jour de méthyldiazine sans difficulté.

La toxicité chronique des diazines est également très faible. Un de nos malades atteint d'endocardite infectieuse reçoit 10 g. de

méthyldiazine par jour depuis deux mois sans que l'on ait pu remarquer aucune trace d'intoxication. Parmi nos malades nous n'avons observé qu'un cas de leucopénie sérieuse chez la petite malade dont nous avons parlé ; cette enfant avait reçu 550 g. de sulfamides dont 350 de sulfadiazine en moins de deux mois. Cet incident a régressé assez rapidement dès la fin du traitement.

*
* *

Tous les auteurs notent la *tolérance* remarquable de ces nouveaux produits. Les petits incidents tels que céphalée, douleurs gastriques, nausées, vomissements, étourdissements, bourdonnements d'oreilles, névrites, cyanose, éruptions diverses ne se produisent qu'exceptionnellement, même après l'administration de doses élevées et prolongées ; nous n'avons observé avec la sulfadiazine et la méthyldiazine ni atteinte rénale, ni lésions des voies urinaires, ni hématuries. Cet avantage doit être attribué au fait que les dérivés acétylés des diazines sont beaucoup plus solubles que les autres sulfamides acétylés et plus solubles que les diazines elles-mêmes (Roblin, Williams, Winnek et English) ; nous empruntons à Vonkennel les chiffres suivants :

Solubilité des diazines et de leurs dérivés acétylés dans une solution de phosphate M/15 en fonction du pH :

PRODUIT	pH 4,94	pH 5,90	pH 7,00	pH 8,02
1162 F.	0,694	0,704	0,698	0,694
Acétyl 1162 F	0,144	0,144	0,144	0,143
Adiazine	0,0087	0,0101	0,033	0,027
Acétyldiazine	0,0082	0,0132	0,084	0,253

Ces chiffres d'ailleurs n'ont qu'un intérêt restreint. Il existe dans les urines des substances solubilisantes qui permettent d'y obtenir des concentrations beaucoup plus élevées. Certains de nos malades ont éliminé la sulfadiazine et la méthyldiazine à des concentrations dépassant 1.200 mg. pour 100, sans incident. Notons toutefois avec Krüger-Thiemer l'intérêt qu'il y a d'alcaliniser le plus possible des urines. Schölzke et Mussnug, estimant que le foie est particulièrement exposé aux lésions par les sulfamides, ont recours pour étudier la tolérance de la sulfadiazine aux épreuves préconisées par Schreus, Gahlen et Nurnberger à propos du prontosil et de l'albucid. Ils dosent l'urobiline dans les urines et la bilirubine dans le sang, pratiquent la réaction de Takata-Ara sur le sérum sanguin et font l'épreuve de la galactosurie provoquée selon la méthode de Bauer : sur 66 dosages d'urobiline, 2 seulement sont

augmentés, la réaction de Takata-Ara est deux fois douteuse et le taux de la bilirubine reste constamment normal, ainsi que l'épreuve de galactosurie provoquée.

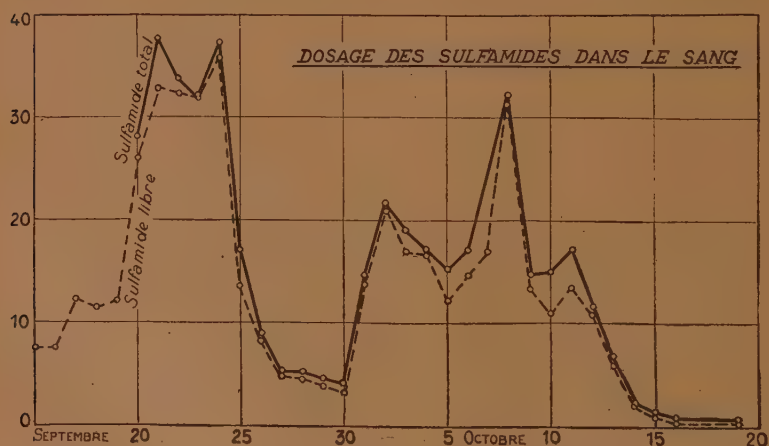
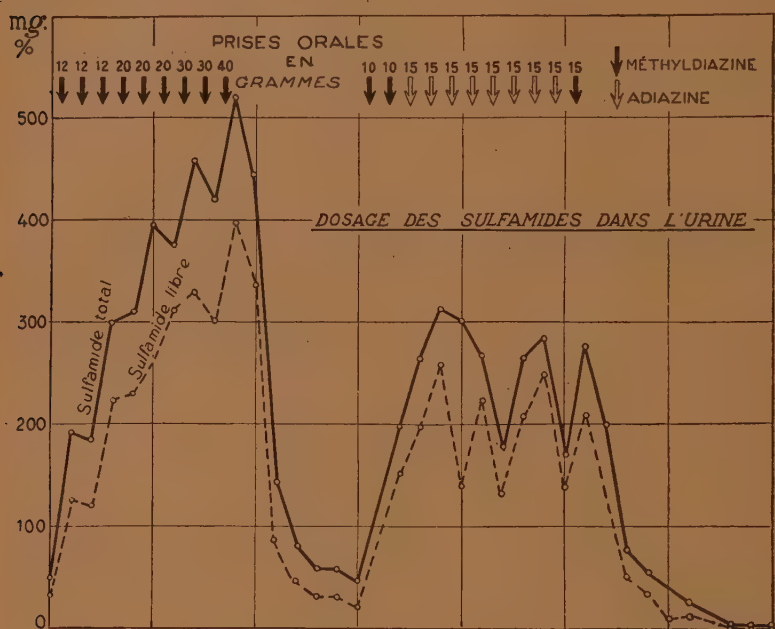
Nous n'avons observé que quelques nausées et quelques poussées érythémateuses avec prurit; ces manifestations, qui apparaissent dès le début, sont le plus souvent fugaces et n'empêchent pas de continuer le traitement. Il nous faut toutefois signaler un incident que nous avons vu se reproduire à plusieurs reprises chez deux de nos malades atteints de maladie d'Osler. Nous étudions dans une autre communication le mécanisme de cette intolérance.

Le premier malade présente au huitième jour d'une cure de méthyldiazine à doses progressivement croissantes des phénomènes d'intolérance avec température à 39°, violentes céphalées frontales, inappétence entraînant la suspension du traitement; en même temps apparaissent des signes méningés, une ponction lombaire pratiquée trois jours plus tard montre un liquide purulent, légèrement teinté de sang, contenant 2.300 éléments, dont 75 p. 100 de polynucléaires. Le traitement est repris le lendemain de cet examen; tandis que tout rentre dans l'ordre, le malade prend 15 g. de sulfadiazine sans inconvénient; au neuvième jour de ce traitement la température remonte, le malade fait une éruption exanthématique généralisée avec prurit; le lendemain nouvelle réaction méningée avec 8.500 éléments. Le traitement est à nouveau suspendu. Repris avec de la méthyldiazine vingt jours plus tard, il doit être interrompu au bout de quatre heures (le malade a reçu 3 g. du produit) du fait de l'intolérance: éruption, céphalées violentes, raideur de la nuque. Depuis, le traitement a été repris sans incident. Notre second malade a présenté à deux reprises des phénomènes semblables.

*
* *

L'étude de l'absorption et de l'élimination des diazines est due principalement aux Américains. Peterson, Strauss, Laskey-Taylor et Finland administrent une dose unique de 5 g. de sulfadiazine à des sujets ambulants, exempts d'affection rénale. Ils constatent que la concentration sanguine est atteinte immédiatement si le produit a été injecté par voie veineuse, au bout de deux à trois heures avec une injection parentérale, au bout de six heures après une administration *per os*. Quelle que soit la voie d'introduction du médicament, 60 p. 100 passent dans les urines au cours des vingt-quatre premières heures, 75 p. 100 au cours des trois premiers jours. Reinhold, Flippin, Schwartz et Domm arrivent à des conclusions analogues. Plummer et Ensworth étudient l'élimination d'une dose unique de 2 g. de sulfadiazine: au bout de douze heures, 0,359 g. de sulfamide libre et 0,202 g. de sulfa-

mide conjugué sont éliminés ; au cours des douze heures qui suivent, les reins éliminent encore 0,213 g. de sulfamide libre et



0,183 g. de sulfamide conjugué. Sadust et Tredway confirment ces résultats ; l'élimination de la sulfadiazine est plus lente que celle du sulfathiazol. Cette particularité, jointe à son absorption relative-

vement rapide, que possède également le 693, est précieuse au cours de la lutte contre les germes du type pneumocoque, qui ne subissent que lentement l'action des sulfamides.

Chez tous nos malades nous avons pratiqué des dosages quotidiens de sulfamide libre et conjugué dans le sang et les urines. Grâce à la tolérance parfaite des diazines, permettant l'administration de doses considérables de produit, nous avons obtenu dans le sang et le liquide céphalo-rachidien de nos malades des concentrations extrêmement élevées ; c'est ainsi que nous avons maintenu chez Monique Th... une concentration dans le liquide céphalo-rachidien de 64 mg. p. 100 pendant quatre jours. Cette concentration est restée supérieure à 50 mg. p. 100 pendant vingt jours. Couramment, nous avons atteint dans le sang des doses de 25 à 30 mg. p. 100. L'administration des diazines nous a permis à plusieurs reprises de constater un fait sur lequel nous nous proposons de revenir : l'association d'un sulfamide du type 1162 F aux diazines permet d'obtenir dans les humeurs des concentrations en sulfamides plus élevées que celles obtenues avec les diazines seules. Le nourrisson C... reçoit pendant quarante-huit heures 5 g. de méthyldiazine par jour ; le taux des sulfamides dans le liquide céphalo-rachidien s'équilibre aux environs de 12 mg. p. 100. Les jours suivants, il reçoit 3 g. de méthyldiazine et 2 g. de 1162 F par jour ; la concentration atteint dès le lendemain 26 mg. p. 100. Par la suite on lui administre 4 g. par jour de méthyldiazine et 3 g. de 1162 F ; le liquide céphalo-rachidien contient 45 mg. de sulfamide p. 100. Quelques jours plus tard, la méthyldiazine est remplacée par une même dose de sulfadiazine ; la concentration dépasse 50 mg. p. 100.

Nous rapportons ici les courbes obtenues pour un de nos malades traité par différentes doses de diazines *per os* uniformément réparties sur les vingt-quatre heures. Le sang n'a atteint sa concentration maxima que vers le cinquième et sixième jour, suivant une courbe de croissance rectiligne ; après la cessation du traitement la concentration tombe de moitié en vingt-quatre heures ; puis elle diminue peu à peu, en quatre ou cinq jours le sang ne contient plus de sulfamides. L'acétylation est négligeable. Les diazines passent rapidement dans les urines ; au bout de vingt-quatre heures la concentration atteint la moitié de la concentration moyenne au cours du traitement ; celle-ci est atteinte vers le troisième ou le quatrième jour. Après la fin du traitement, l'élimination se fait lentement en cinq ou six jours. L'acétylation est faible et oscille entre 1/4 et 1/3.

*
* *

La sulfadiazine et la méthyldiazine sont des produits de choix de la chimiothérapie. Ils sont les sulfamides les moins toxiques

pour une efficacité égale. L'organisme les tolère d'une façon remarquable. Les quelques incidents observés sont bénins. Nous ne saurions trop insister sur les possibilités thérapeutiques que nous ouvre l'administration des doses élevées et prolongées qui permettent d'obtenir des concentrations énormes dans le liquide céphalo-rachidien et dans le sang, à notre connaissance jamais atteintes jusqu'à ce jour, efficaces contre des germes même très sulfamido-résistants.

BIBLIOGRAPHIE

- FEINSTONE, WILLIAMS, WOLF, HUNTINGTON et CROSSLEY, *Bull. Johns Hopkins Hosp.*, 1940, **67**, 427.
- KRUGER-THIEMER, *Arch. Dermat. à. Syphilis*, 1942, **183**, 1.
- LONG (Perrin H.), *J. Am. Med. Assoc.*, 21, 1941, **116**, 2399.
- MARTIN (R.), SUREAU (B.), BOURCART (N.) et BABOUOT (P.), *Soc. Méd. Hôp. Paris*, 23 octobre 1943.
- PETERSON, STRAUSS, LASKEY-TAYLOR et FINLAND, *Am. J. Med. Soc.*, 1941, **201**, 367.
- PLUMMER et ENSWORTH, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1940, **45**, 734.
- REINHOLD, FLIPPIN, SCHWARTZ et DOMM, *Am. J. Med. Soc.*, 1941, **201**, 1.
- ROBLIN, WILLIAMS, WINNEK et ENGLISH, *J. Am. Chim. Soc.*, 1940, **62**, 2002.
- SADUST et TREDWAY, *Yal Biol. a Med.*, 1941, **134**, 739.
- SCHMIDT (B.), *Monatschr. Ohrenheilkunde à. Laryngologie*, 1943, **77**, 6.
- SCHÖLZKE et MUSGUG, *Dermat. Wochenschr.*, 1942, **114**, 241.
- SCHREUS et SCHOLSKE, *Dermat. Wochenschr.* 1942, **114**, 225.
- VONKENNEL, *Deutsch. Med. Wochenschr.* 1942, **39**, 953, et **40**, 985.

ASSOCIATION DES MICROBIOLOGISTES DE LANGUE FRANÇAISE

(*Institut Pasteur, 25, rue du Docteur-Roux, Paris, 15^e.*)

Séance du 13 avril 1944.

COMMUNICATIONS (*SUITE ET FIN*)

DÉTERMINATION DU POUVOIR PYRÉTOGÈNE DE QUELQUES VACCINS ÉTUDE EXPÉRIMENTALE

par M. GALLIX.

Il nous a semblé un peu paradoxal de voir employer comme agents pyrétogènes des vaccins dont le mode de préparation est souvent choisi en vue de réduire les réactions post-vaccinales, dont la principale est la fièvre. Aussi avons-nous effectué une étude comparative de quelques vaccins, utilisés assez couramment en clinique comme agents pyrétogènes.

Dans le premier travail, nous nous sommes proposé de voir si certaines espèces bactériennes avaient une aptitude particulière à cet égard. Nous comptons examiner ensuite la possibilité d'améliorer l'effet thérapeutique de choc thermique en employant des vaccins préparés dans un but purement pyrétogène et non plus dans un but antiinfectieux.

Notre étude a porté sur les préparations suivantes :

N° 1. — Bouillon vaccin antipyogène (1).

N° 2. — Vaccin antipyogène. Emulsion aqueuse. Titre 6 milliards et autolysat.

N° 3. — Vaccin antichancrelleux. Emulsion aqueuse. Titre 225 millions.

N° 4. — Vaccin antigonococcique (fort et sans germes associés). Emulsion aqueuse. Titre 4 milliards.

N° 5. — Vaccin antigonococcique (2) (faible et avec germes associés). Emulsion aqueuse. Titre 375 millions.

(1) Nous avons utilisé le vaccin de Delbet.

(2) Il s'agit de vaccins préparés suivant la technique de Ch. NICOLLE et DURAND.

Nos essais ont été effectués sur le lapin qui semble être l'animal de laboratoire se prêtant le mieux à ce genre de recherches.

Les animaux étaient choisis d'un poids voisin de 2 kg., mis à jeun et isolés douze heures avant le début des expériences.

Avant injection du vaccin à essayer, la température rectale était prise trois ou quatre fois, de demi-heure en demi-heure, et seuls les animaux dont la température normale était assez stable (variation de 1 à 2/10 de degré) étaient retenus.

Après l'injection, la température continuait à être prise chaque demi-heure, pendant quatre heures pour certains essais, pendant huit heures pour d'autres; les animaux étant toujours maintenus au calme dans le même local et manipulés sans brutalité.

A part le bouillon-vaccin (n° 1) qui a été utilisé par la voie sous-cutanée, tous les autres ont été injectés par la voie endo-veineuse

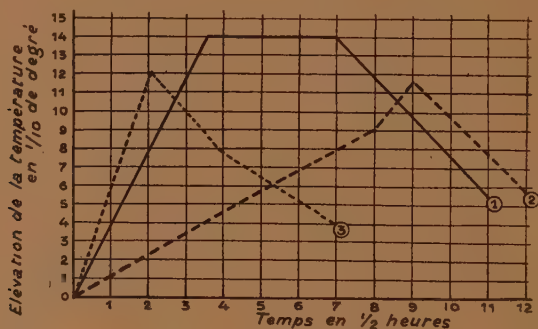


Fig. 1. — Action pyrétogène comparée du bouillon-vaccin antipyrogène n° 1 (courbe 1), du bouillon de viande peptoné à 1 p. 100 (courbe 2) et d'une émulsion vaccinale faible (courbe 3).

(veine marginale de l'oreille du lapin). La dose injectée a été de 2 c. c. pour tous les vaccins.

Le même produit a toujours été essayé sur plusieurs lapins et chaque expérience a toujours été faite en prenant des animaux témoins qui recevaient 2 c. c. d'eau salée à 8 p. 1.000.

Les résultats de chaque expérience ont été consignés sur un graphique portant en abscisses les temps exprimés en demi-heures, l'origine des temps étant le moment où le vaccin est injecté, et en ordonnées les différences de température en dixième de degré, la température moyenne avant l'injection étant prise comme origine.

Le peu de place dont il est possible de disposer ne nous permet de joindre à ce texte, à titre d'exemple, que quelques-uns des graphiques que nous avons obtenus.

Comparativement au bouillon-vaccin antipyrogène n° 1, nous avons recherché le pouvoir pyrétogène du bouillon peptoné qui sert de base à sa préparation dans le but surtout de déterminer la part qui revient, dans l'effet thermique, au bouillon peptoné et celle due aux éléments microbiens.

Enfin, nous avons étudié un vaccin antichancrelleux et un vaccin antigonococcique préparés suivant la technique de Ch. Nicolle, mais ayant la même densité optique que le vaccin antigonococcique fort n° 4.

Les conclusions qu'on peut tirer de nos essais sont les suivantes :

1° On retrouve chez le lapin la réaction thermique qui fait employer en clinique certains vaccins comme agents pyrétogènes.

2° *Bouillon-vaccin antipyogène n° 1.* — Parmi les vaccins que nous avons examinés, le vaccin antipyogène de Delbet (n° 1) occupe une

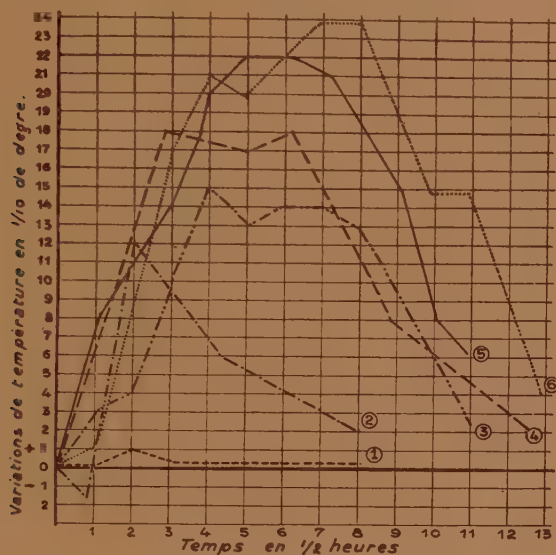


FIG. 2. — 1, témoin; 2, vaccin antichancrelleux normal ou antigonococcique faible (n° 3 et n° 5); 3, vaccin antipyogène n° 2; 4, vaccin antigonococcique renforcé; 5, vaccin antigonococcique fort n° 4; 6, vaccin antichancrelleux renforcé.

place particulière, tant par sa composition — bouillon-vaccin — que par la voie sous-cutanée par laquelle on l'administre.

L'onde fébrile qu'il provoque est d'intensité moyenne et d'assez longue durée (fig. 1).

3° *Bouillon peptoné de viande.* — La réaction thermique donnée par le bouillon de viande peptoné est inférieure à celle du bouillon-vaccin antipyogène à la fois par la précocité, l'intensité et la durée. L'action surajoutée de l'élément bactérien est donc certaine (fig. 1).

4° *Émulsions aqueuses [vaccins n° 2, 3, 4 et 5] (fig. 2).* — Sans préjuger de l'intensité, les émulsions aqueuses de corps microbiens donnent des réactions thermiques plus précoces, mais plus brèves que les bouillons-vaccins.

Bien qu'étant un vaccin antipyogène comme le bouillon-vaccin n° 1, l'émulsion aqueuse vaccinale antipyogène (n° 2) doit être plutôt rap-

prochée des autres vaccins examinés (n° 3, 4 et 5), qui sont, comme elle, des émulsions aqueuses de corps microbiens.

De ces 4 émulsions, toutes administrées par voie endo-veineuse, le vaccin antigonococcique fort (n° 4) est nettement celui qui provoque l'onde fébrile la plus importante en élévation et en durée. À volume égal, le vaccin antichancrelleux (n° 3) et le vaccin antigonococcique faible (n° 5) ont un effet pyrétogène plus faible.

Le pouvoir pyrétogène de l'émulsion aqueuse antipyrogène (n° 2) se situe entre celui du vaccin antigonococcique fort (n° 4) d'une part, et celui du vaccin antichancrelleux (n° 3) et du vaccin antigonococcique faible (n° 5) d'autre part.

5° Mais il suffit d'amener la concentration en corps microbiens de ces deux derniers (qui est notablement plus faible) au même titre que celle du vaccin antigonococcique fort pour obtenir un pouvoir pyrétogène analogue.

L'influence de la densité microbienne est donc bien nette sans pour cela que, par voie de conséquence, il faille considérer comme nulle l'influence des espèces bactériennes utilisées. En effet, l'émulsion aqueuse antipyrogène, malgré sa très forte concentration en corps microbiens, de beaucoup supérieure à celle du vaccin antigonococcique fort, n'a pas un pouvoir pyrétogène aussi élevé. Il semble donc que le gonocoque provoque une réaction thermique plus élevée que les germes pyrogènes.

En terminant, nous insistons sur le fait que nos essais sont des essais expérimentaux sur le lapin dont les résultats ne sauraient être transposés intégralement en clinique sans la réserve d'usage.

Nous nous proposons de répondre plus précisément dans un prochain travail à la deuxième question que nous posions au début de cet exposé quant à l'intérêt qu'il pourrait y avoir à utiliser, comme agents pyrétogènes, des préparations microbiennes effectuées spécialement dans ce but.

(Laboratoire des vaccins Specia, Livron.)

PRÉSENTATION D'UNE ÉTUVE A MICROSCOPE

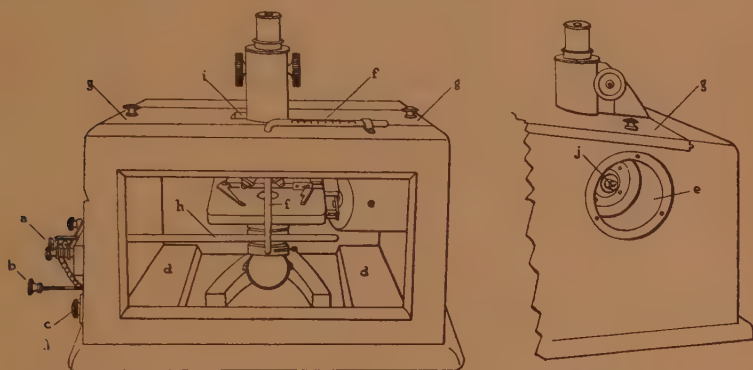
par R. DESCHIENS, C. JOUAN et L. LAMY.

Les observations microscopiques relatives à la biologie, à la croissance, au cycle évolutif ou aux cultures de microorganismes, de protistes ou d'invertébrés thermophiles nécessitent un dispositif permettant d'obtenir dans l'espace correspondant aux examens pratiqués une température déterminée, constante. Il en est ainsi, par exemple, pour l'étude des entamibes parasites de l'appareil digestif, des infusoires de la panse des ruminants, des adultes, des œufs et des larves de certains helminthes parasites.

Plusieurs équipements permettent à des degrés divers d'obtenir ce résultat. L'observation peut être réalisée dans une pièce-étuve dans laquelle s'installe l'observateur ; ce procédé, parfois nécessaire, est oné-

reux et incommode s'il faut observer longtemps et si la température d'observation est située au voisinage de 37° . Les platines chauffantes du type de la platine de Malassez peuvent rendre des services pour les examens rapides, mais ne permettent pas de réaliser un chauffage régulier et homogène, ni de faire des observations prolongées.

L'étuve à microscope de Foot rend des services ; elle est constituée par un coffrage parallélépipédique de bois, muni de lampes chauffantes et d'ouvertures à rideau ou à manchettes permettant à l'observateur de commander les chariots ou les valets de la platine d'un microscope placé à l'intérieur ; elle est pratique et d'usage courant dans les laboratoires de parasitologie, mais présente plusieurs inconvénients qui ne permettent pas une observation prolongée à une température constante. Elle est en effet dépourvue d'un régulateur de température et elle est



Étuve à microscope. *a*, *b*, *c*, vis de commande du régulateur thermique; *d*, résistance électrique; *e*, manchon d'acier aux boutons du chariot mobile; *f*, thermomètre coudé; *g*, volets-coulissants; *h*, tige de laiton-invar du thermostat; *i*, coquille d'accès à la vis micrométrique du microscope; *j*, boutons du chariot mobile du microscope.

insuffisamment étanche, notamment au niveau des ouvertures permettant l'introduction des mains de l'opérateur. Il en résulte que la température obtenue dans la boîte de Foot en ordre de marche, peut présenter des écarts de l'ordre de 20 à 25 p. 100 par rapport à l'équilibre recherché, c'est-à-dire que si l'on désire observer à une température de 37° on pourra avoir, au cours d'une même observation, portant sur une demi-heure par exemple, des températures se situant entre 29° et 44° .

L'étuve que nous vous présentons n'offre pas ces inconvénients, elle est thermostable : elle est en effet pourvue d'un régulateur thermique du type bi-lame d'étuve bactériologique ou de thermostat, et le système d'emboîtement du microscope et d'accès à ses organes de commandes assure une bonne étanchéité. La température du système, pour un réglage donné, 37° par exemple, est en équilibre à 1/4 de degré près, c'est-à-dire avec un écart possible de moins de 1 p. 100 qui cons-

titue une précision très suffisante pour les recherches auxquelles il est destiné.

L'étuve est construite en chêne verni d'environ 2 cm. d'épaisseur, ses dimensions intérieures sont : 32 cm. en largeur, 26 cm. d'avant en arrière, et 18,5 cm. en hauteur moyenne, l'avant étant légèrement plus haut que l'arrière.

La paroi antérieure, côté avant du microscope, est vitrée pour permettre l'éclairage du miroir du statif ; la paroi postérieure est faite d'une porte ouvrante par laquelle l'opérateur place la préparation sur la platine. Enfin, la paroi supérieure inclinée est constituée par deux volets coulissant dans une glissière rainure et venant enserrer le tube et la potence du microscope aussi exactement que possible grâce à des échancrures appropriées.

Il est nécessaire d'accéder aux deux commandes rapide et lente, de mise au point, d'une part, aux deux boutons du chariot mobile d'autre part.

La commande du mouvement rapide par crémaillère est assez haut placée, tout à fait hors de l'étuve, donc très accessible. Dans les anciens statifs à vis micrométrique verticale, dans le tube vertical de la potence, le bouton de commande du mouvement lent est également hors de l'étuve. Pour les statifs modernes à vis micrométrique latérale, il a fallu échancrer le volet supérieur droit, et fixer, dans cette entaille, une sorte de coquille creuse passant en dessous de la commande du mouvement lent ; un feutre assure une étanchéité suffisante en ce point.

Les commandes du grand chariot de Stiassnie par deux boutons concentriques ont été rendues facilement accessibles du côté gauche de l'étuve en disposant, sous une ouverture circulaire de 10 cm. de cette paroi, un manchon cylindrique qui permet, à la main, l'accès commode aux deux boutons ; le fond du manchon est fait d'un feutre ou d'un drap tendu, fendu horizontalement pour laisser passer l'axe des boutons de commande. Dans l'intervalle des observations, tout le manchon peut être rempli par un gros tampon de coton ou obstrué par un volet extérieur.

Le chauffage est assuré par deux résistances électriques couplées en série et fixées sous écrans à droite et à gauche, latéralement, de chaque côté du pied du microscope ; l'intensité que permettent ces résistances est telle que la température pourrait atteindre 50° environ.

Pour obtenir la température convenable, 37° en général, un thermo-régulateur laiton-invar de faible capacité calorifique est disposé transversalement à la hauteur de la platine du microscope et en avant, avec réglage extérieur à l'étuve ; il maintient à 1/4 de degré près la fixité de la température en ce point.

Enfin, un thermomètre coudé dont le réservoir descend auprès de la platine, et dont la tige graduée est fixée horizontalement sur le dessus de l'étuve, permet de contrôler, avec commodité, les variations de température.

Avec cet équipement, l'observation microscopique prolongée, entre 30° et 40° en goutte pendante, en chambre humide de Ranvier, en micro-aquarium et en chambre à gaz ou à vapeurs peut être facilement réalisée et dirigée. Nous nous sommes attachés à mettre au point un appareil précis, mais simple, robuste et d'un prix de revient peu élevé ; il comportera, dans des temps plus faciles, un luxe inévitable de perfectionnements, mais tel qu'il est, il représente un matériel pratique et une amélioration par rapport à ses devanciers.

(Institut Pasteur. Groupe des services de Parasitologie.)

Séance du 4 mai 1944.

PRÉSIDENTE DE M. NOËL BERNARD.

COMMUNICATIONS

**INTRADERMO-RÉACTIONS ET ALLERGIES
COMPARÉES A LA TUBERCULINE
ET AUX ANTIGÈNES TYPHO-PARATYPHOÏDIQUE
ET DIPHTÉRIQUE
AU COURS D'AFFECTIONS
DU TISSU RÉTICULO-ENDOTHÉLIAL ET LYMPHOÏDE**

par R. SOHIER.

Etant donné la fréquence avec laquelle on constate la négativité des réactions tuberculiniques, au cours des affections atteignant électivement le tissu réticulo-endothélial et lymphoïde, il pouvait être de quelque intérêt d'étudier, selon la méthode précédemment rappelée, le comportement du tégument vis-à-vis d'autres antigènes typho-paratyphoïdique et diphtérique révélateurs d'allergies spécifiques (acquises comme il arrive fréquemment pour la tuberculose de façon occulte) et de suivre l'évolution des intradermo-réactions.

Sur 4 sujets atteints de la maladie de Besnier-Boeck-Schaumann (toutes contrôlées par biopsie et négativité des inoculations au cobaye), lors de notre premier examen, 3 (F..., quinze ans; C..., trente-quatre ans, et M..., trente-huit ans) avaient leurs 3 intradermo-réactions (I. D.) négatives. L'un, D..., conservait une I. D. positive au T.A.B. Observés pendant une période allant de quinze à deux mois, ces sujets ont permis les constatations suivantes :

Pour 3 d'entre eux, les réactions ne se sont pas modifiées. Les trois premiers, F... et C... ont, l'un pendant quinze mois, au bout desquels il a guéri complètement, l'autre pendant deux mois, conservé leur réactivité complète aux trois antigènes; le troisième, D..., a pendant cinq mois constamment présenté une I. D. positive seulement au T.A.B. Quant au quatrième, M..., on a vu apparaître après onze mois une positivité légère de la réaction tuberculinique et également de celle au T.A.B.

Deux sujets atteints de la maladie de Hodgkin avaient initialement une I. D. tuberculinique et une anatoxi-réaction diphtérique négatives, alors qu'ils réagissaient à l'antigène typho-paratyphoïdique. L'un d'eux n'a pu être observé que pendant deux mois. L'autre suivi pendant sept mois, après

avoir réagi plusieurs fois au T.A.B. alors que l'I. D. tuberculinique restait négative, a eu tous les tests cutanés négatifs quatorze jours avant sa mort.

Citons enfin deux malades : l'un présentait une image micronodulaire pulmonaire à l'exclusion de tout autre symptôme, avec un état général floride et apyrétique, considérés comme relevant vraisemblablement d'une maladie de Besnier-Bœck-Schaumann, mais dont la preuve n'a pu être apportée. Initialement les réactions étaient dissociées (tuberculine négative, T.A.B. et diphtérie positives), après six mois, alors que les lésions pulmonaires avaient notablement rétrogradé, l'I. D. tuberculinique devenait positive, les autres I. D. restaient inchangées. L'autre, ayant une adénopathie médiastine importante de nature indéterminée, avec un bon état général et apyrexie, avait à deux mois d'intervalle des tests cutanés tuberculiniques et diphtériques négatifs, alors que l'I. D. typho-paratyphoïdique restait positive.

Les constatations précédentes peuvent se résumer comme suit :

Au cours d'affections frappant le tissu réticulo-endothélial et lymphoïde, considérées jusqu'à plus ample informé comme de nature non tuberculeuse, telles que la maladie de Besnier-Bœck-Schaumann, ou la maladie de Hodgkin, on observe parfois une dissociation des tests cutanés d'allergie. Lorsqu'une réaction reste positive, les autres étant négatives, c'est habituellement l'I. D. typho-paratyphoïdique. Cette réaction peut à son tour devenir négative peu de temps avant la mort.

Si toutes les I. D. sont initialement négatives et que la réaction tuberculinique devienne positive, il arrive que simultanément l'I. D. typho-paratyphoïdique apparaisse également positive.

On en viendrait donc à admettre pour l'instant, d'après ces quelques observations, qui devront être complétées par d'autres, que les processus touchant le système réticulo-endothélial ne suspendent pas toujours simultanément toutes les réactions d'allergie spécifique, sauf peu de temps avant la mort. Comme il semble que tout en ayant leur spécificité, les manifestations allergiques à divers antigènes sont régies par un même système, on peut supposer qu'un même processus peut atteindre inégalement les réactions dépendant d'antigènes différents, dont les seuils d'action sont eux aussi différents.

Le Gérant : G. MASSON.

ASSOCIATION DES MICROBIOLOGISTES DE LANGUE FRANÇAISE

(Institut Pasteur, 25, rue du Docteur-Roux, Paris, 15°.)

EXTRAIT DES STATUTS :

Article premier. — L'association dite Association des Microbiologistes de Langue Française, fondée en 1937 à Paris, a pour but de grouper les Microbiologistes de langue française et de créer entre eux un lien. Elle a son siège à Paris.

Elle se compose de membres nationaux et de membres étrangers de toutes langues.

La langue française est la langue officielle des Congrès de l'Association.

Art. 2. — Elle est instituée uniquement pour l'étude et la discussion en commun de toutes les branches de la Science microbiologique.

Art. 3. — Peut faire partie de l'Association toute personne remplissant une fonction scientifique dans un laboratoire de Microbiologie (Microbiologie, Pathologie infectieuse, Immunologie, Chimiothérapie, Cancérologie), ou ayant publié des travaux de Microbiologie.

.....
Art. 9. — Les auteurs des communications et démonstrations devront être membres de l'Association. Les étrangers à l'Association ne seront acceptés comme auteurs, que s'ils ont pour co-signataires un membre de l'Association, ou s'ils ont été invités par le Bureau à faire une communication, ou si un membre de l'Association ayant assisté aux recherches rapportées se charge de discuter le travail en séance.

Les membres français de l'Association constituent *ipso facto* et de plein droit, la SECTION FRANÇAISE de l'ASSOCIATION INTERNATIONALE DE MICROBIOLOGIE.

En dehors des Congrès, dont la périodicité et la date sont fixées par l'Assemblée Générale sur la proposition du Bureau, l'Association se réunit en séances consacrées à des communications scientifiques, *le premier jeudi de chaque mois* (août et septembre exceptés), à 16 heures. Les séances ont lieu au Grand Amphithéâtre de l'Institut Pasteur ; elles sont publiques.

Les membres désirant présenter des communications sont priés d'en aviser le Secrétaire général, et de lui en communiquer le titre, pour permettre l'établissement de l'ordre du jour de la réunion.

Le texte des communications doit être remis à la séance, établi *ne varietur*, en exemplaire dactylographié original. La bibliographie

des auteurs cités sera établie, conformément aux règles admises par l'Association Internationale de Microbiologie, dans l'ordre suivant : *nom* de l'auteur, *titre* du périodique (en abrégé et en italiques), *année* de publication, *tome* (en chiffres arabes gras), *page*. Les signes t., p., etc., sont supprimés. Les abréviations des noms de périodiques courants figurent sur une liste qui sera adressée aux auteurs sur leur demande. Les figures illustrant le texte doivent être remises avec leurs clichés typographiques, sinon il pourra en résulter des délais de publication. La Rédaction se charge, le cas échéant, de faire faire tous les dessins, graphiques, tracés, et de faire cliquer, aux frais des auteurs, tous les documents qui lui seront adressés à temps, soit huit jours au moins avant la séance, pour parution dans le numéro suivant des *Annales de l'Institut Pasteur*.

En raison des restrictions apportées aux publications par les circonstances actuelles, le texte de chaque communication ne pourra occuper plus de deux pages de l'emplacement réservé dans les *Annales de l'Institut Pasteur*, soit environ 1.200 mots. Les références bibliographiques et les clichés, s'il y en a, seront compris dans cet espace. Toute communication dépassant ce maximum sera retournée à son auteur, ou devra avoir été préalablement acceptée par la Rédaction des *Annales de l'Institut Pasteur*, pour y paraître en Mémoire.

Le Secrétaire général : P. LÉPINE.

Séances du 13 avril et du 4 mai 1944.

SOMMAIRE

Détermination du pouvoir pyrétogène de quelques vaccins. Etude expérimentale, par M. GALLIX.	217
Présentation d'une étuve à microscope, par R. DESCHIENS, C. JOUAN et L. LAMY.	220
Intradermo-réactions et allergies comparées à la tuberculine et aux antigènes typho-paratyphoïdique et diphtérique au cours d'affections du tissu réticulo-endothélial et lymphoïde, par R. SOHIER	223